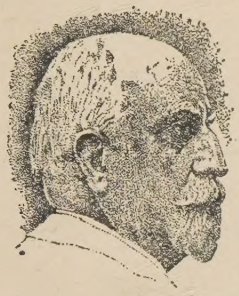
VOLUMEN 8 ENERO-MARZO 1955 NUM. 1

# Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
28 MAR 19

# SUMARIO

Página

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

La población microbiana de las salmueras de aceitunas, por **Antonio Izquierdo Tamayo** ... ... ... ... ... ... ... ... ... 3

Obtención de antígenos y sueros hiperinmunes de las encefalitis de San Luis, Japonesa B, Equinas Este y Oeste y ensayos de fijación de complemento con los mismos. I, por **A. P. García Gancedo** ... ... ... ... ... ... ... ... 15

Estudios sobre nódulo-bacterias. I, por **Gregorio Fraile Ramos** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... 55

INFORMACION

Primera Reunión Europea de Normalización Biológica ... ... 95

Conferenciantes italianos ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... 95

Actas de la Sociedad ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... 96

IX Congreso Internacional del Frío ... ... ... ... ... ... ... 96

SE SUPLICA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 144 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.

VOLUMEN 8 ENERO-MARZO 1955 NUM. 1

# Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

## CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. don Arnaldo Socías Amorós, Director del Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, del C. S. I. C.

Prof. Dr. don Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. don Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Gráficas **TEJARIO, S. A.** Pza. del Biombo, 4.-Tel. 22 12 88-Madrid

*C. S. I. C.*
*INSTITUTO DE LA GRASA Y SUS DERIVADOS*

# LA POBLACION MICROBIANA DE LAS SALMUERAS DE ACEITUNAS

por
Antonio Izquierdo Tamayo.

En trabajos anteriores (1 y 2) nos hemos ocupado del proceso microbiológico en la fermentación de las aceitunas verdes, aderezadas al estilo sevillano. Hacíamos en dicho estudio diferentes consideraciones sobre las fases de la fermentación, así como sobre las especies de microorganismos causantes de la misma y de sus posibles alteraciones. El presente trabajo tiende a completar aquél en cuanto a los datos cuantitativos de la población microbiana y a reforzar sus conclusiones en cuanto a la naturaleza o clasificación de las bacterias encontradas en la salmuera.

Para realizar las observaciones que constituyen el tema de esta nota hemos utilizado salmueras de aceitunas del almacén de los señores Bruguier y Trujillo, tomadas diariamente de dos bocoyes marcados: uno de aceitunas gordales y otro de manzanillas. Con objeto de comprobar las diferencias que pudiese haber se hizo posteriormente lo mismo con dos bocoyes del final de la campaña; prácticamente podemos decir que con dos de los últimos bocoyes que se llenaron. Al momento de recoger las muestras eran hechas las determinaciones de acidez y pH por el laboratorio de química y pasaban las muestras al de microbiología, donde se realizaban las diluciones convenientes por los procedimientos al uso y se sembraban en placas con agar-infusión de levadura glucosada a pH 5 para el recuento y aislamiento de colonias de Lactobacillus y levaduras; paralelamente se sembraban (*) diluciones en medio de Levine

(*) Una vez más queremos destacar aquí la labor de nuestra laborante señorita Ana María Navas Riao, sobre la que ha recaído la parte más ingrata de las siembras y recuentos.

para el aislamiento de organismos Gram-negativos. Los recuentos y cálculos consiguientes se realizaron como es costumbre en estas observaciones.

Los datos de todos los recuentos se ofrecen en los cuadros adjuntos.

Igualmente se han confeccionado las gráficas con el logaritmo del número de bacterias vivas, según es costumbre, las que también ofrecemos para mayor claridad en la comprensión de la evolución de las salmueras. También nos ha parecido útil incluir una gráfica de las variaciones de acidez y otra de los cambios de pH, para que se observe su correlación con el auge o decrecimiento de las poblaciones microbianas.

## CUADRO I

Salmuera de aceitunas gordales. (Principio de campaña.)

| Días | Acidez — Grs. por 100 | pH | Microorganismos por c. c. | | Especies predominantes |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Gram-negativos | Gram-positivos | |
| 0 | — | 7,72 | — | - - | Aerobacter y esporógenos del género Bacillus |
| 1 | 0,08 | 5,95 | 145.625 | - - | |
| 2 | 0,10 | 5,6 | 128,250 | 158,000.000 | Lactobacillus con Aerobacter |
| 3 | 0,16 | 5,25 | 460.000 | 3.766,500.000 | |
| 5 | 0,27 | 4,95 | 60.000 | 48,000.000 | |
| 6 | 0,32 | 4,75 | 5.600 | 2.169,000.000 | |
| 8 | 0,45 | 4,5 | 90 | 998,000.000 | |
| 9 | 0,51 | 4,45 | — | 9.065,000.000 | Lactobacillus plantarum y levaduras |
| 10 | 0,52 | 4,4 | — | 1.999,000.000 | |
| 11 | 0,54 | 4,4 | — | 104,000.000 | |
| 12 | 0,55 | 4,4 | - - | 3.456,000.000 | |
| 17 | 0,68 | 4,3 | — | 4.320,000.000 | |
| 23 | 0,79 | 4,2 | — | 2.088,000.000 | |
| 27 | 0,88 | 4,15 | — | 1.728,000.000 | |
| 30 | 0,83 | 4,15 | — | 2.412,000.000 | |
| 39 | 0,84 | 4,1 | — | 3.456,000.000 | |
| 46 | 0,88 | 4,1 | — | 2.106,000.000 | |
| 53 | 0,87 | 4,1 | — | 1.094,000.000 | |
| 70 | 0,86 | 4,1 | — | 588,000.000 | |
| 85 | 0,86 | 4,1 | — | 580,000.000 | |
| 124 | 0,79 | 3,95 | — | 2.000.000 | |

## CUADRO II

Salmuera de aceitunas manzanilla. (Principio de campaña.)

| Días | Acidez — Grs. por 100 | pH | Microorganismos por c. c. | | Especies predominantes |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Gram-negativos | Gram-positivos | |
| 0 | — | 8,25 | — | — | Lactobacillus y esporógenos del géneros Bacillus |
| 1 | 0,00 | 8.25 | 1.600 | — | |
| 2 | 0,06 | 5,3 | 13.000 | 2,320.000 | Lactobacillus con Aerobacter |
| 3 | 0,09 | 5,5 | 16.000 | 22,500.000 | |
| 5 | 0,14 | 5,2 | 6.000 | 316,800.000 | |
| 6 | 0,16 | 5,15 | — | 758,000.000 | Lactobacillus plantarum con levaduras |
| 8 | 0,27 | 4,82 | — | 1.181,900.000 | |
| 9 | 0,27 | 4,8 | — | 4.518,000.000 | |
| 10 | 0,31 | 4,8 | — | 1.538,000.000 | |
| 11 | 0,35 | 4,7 | — | 381,200.000 | |
| 12 | 0,40 | 4,65 | — | 22.140,000.000 | |
| 17 | 0,49 | 4,45 | — | 1.260,000.000 | |
| 23 | 0,62 | 4,3 | — | 1.836,000.000 | |
| 27 | 0,71 | 4,2 | — | 1.224,000.000 | |
| 30 | 0,72 | 4,2 | — | 4.968,000.000 | |
| 39 | 0,81 | 4,1 | — | 3.726,000.000 | |
| 46 | 0,89 | 4,1 | — | 4.596,000.000 | |
| 53 | 0,84 | 4,1 | — | 72,000.000 | |
| 70 | 0,86 | 4,05 | — | 1.584,000.000 | |
| 85 | 0,89 | 4 | — | 5,000.000 | |
| 124 | 0,83 | 3,9 | — | 9,500.000 | |

## CUADRO III

Salmuera de aceitunas gordales. (Final de campaña.)
(Entradas en salmuera el 7 de octubre de 1952.)

| Días | Acidez — Grs. por 100 | pH | Microorganismos por c. c. | | Especies predominantes |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Gram-negativos | Gram-positivos | |
| 3 | 0,11 | 5,55 | 9.000.000 | 306.000.000 | Lactobacillus con Aerobacter |
| 4 | 0,16 | 5,2 | 8.000 | 8.100.000.000 | |
| 8 | 0,45 | 4,6 | — | 2.430.000.000 | Lactobacillus plantarum con levaduras |
| 9 | 0,39 | 4,65 | — | 1.440.000.000 | |
| 13 | 0,54 | 4,45 | — | 15.480.000.000 | |
| 15 | 0,60 | 4,4 | — | 2.520.000.000 | |
| 20 | 0,64 | 4,35 | — | 6.912.000.000 | |
| 22 | 0,67 | 4,35 | — | 4.110.000.000 | |
| 27 | 0,64 | 4,8 | — | 1.383.000.000 | |
| 29 | 0,65 | 4,25 | — | 2.196.000.000 | |
| 41 | 0,81 | 4,2 | — | 1.390.000.000 | |
| 52 | 0,80 | 4,2 | — | 195.000.000 | |
| 105 | 0,77 | 4.05 | — | 4.000.000 | |

## CUADRO IV

Salmueras de aceitunas manzanilla. (Final de campaña.)
(Entradas en salmuera el 7 de octubre de 1952.)

| Días | Acidez — Grs. por 100 | pH | Microorganismos por c. c. | | Especies predominantes |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Gram-negativos | Gram-positivos | |
| 3 | 0,10 | 5,45 | 49.000 | 149.000.000 | Lactobacillus con Aerobacter |
| 4 | 0,15 | 5,2 | 49.000 | 793.000.000 | |
| 8 | 0,37 | 4,75 | — | 1.494.000.000 | Lactobacillus plantarum con levaduras |
| 9 | 0,40 | 4,7 | — | 122.400.000 | |
| 13 | 0,51 | 4,45 | — | 15.120.000.000 | |
| 15 | 0,53 | 4,4 | — | 18.000.000 | |
| 20 | 0,56 | 4,35 | — | 9.273.000.000 | |
| 22 | 0,63 | 4,35 | — | 1.926.000.000 | |
| 27 | 0,6 | 4,9 | — | 1.476.000.000 | |
| 29 | 0,62 | 4,3 | — | 491.000.000 | |
| 41 | 0,88 | 4,1 | — | 1.636.000.000 | |
| 52 | 0,88 | 4,1 | — | 80.000.000 | |
| 74 | 0,78 | 4,15 | — | 1.000.000 | |
| 105 | 0,73 | 4 | — | 22.500.000 | |

EVOLUCION DE LA POBLACION MICROBIANA DE DOS SALMUERAS DE PRINCIPIO DE CAMPAÑA

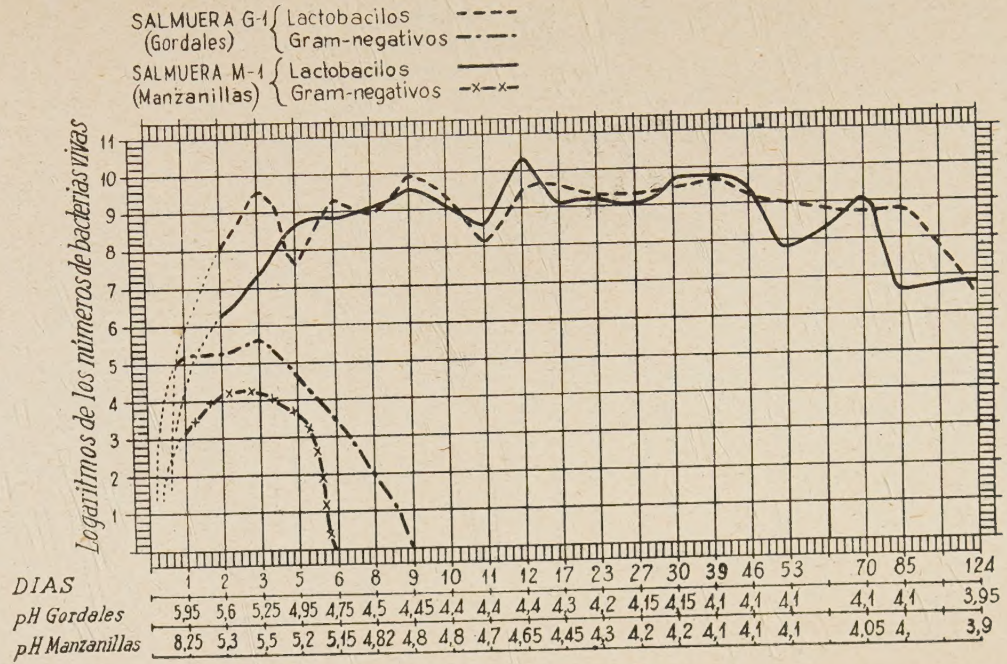

SALMUERA G-1 (Gordales) Lactobacilos
Gram-negativos
SALMUERA M-1 (Manzanillas) Lactobacilos
Gram-negativos
Logaritmos de los números de bacterias vivas
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
DIAS
1 2 3 5 6 8 9 10 11 12 17 23 27 30 39 46 53 70 85 124
pH Gordales
5,95 5,6 5,25 4,95 4,75 4,5 4,45 4,4 4,4 4,4 4,3 4,2 4,15 4,15 4,1 4,1 4,1 4,1 4,1 3,95
pH Manzanillas
8,25 5,3 5,5 5,2 5,15 4,82 4,8 4,8 4,7 4,65 4,45 4,3 4,2 4,2 4,1 4,1 4,1 4,05 4, 3,9

*Fig. 1.*

EVOLUCION DE LA POBLACION MICROBIANA DE DOS SALMUERAS DE FINAL DE CAMPAÑA

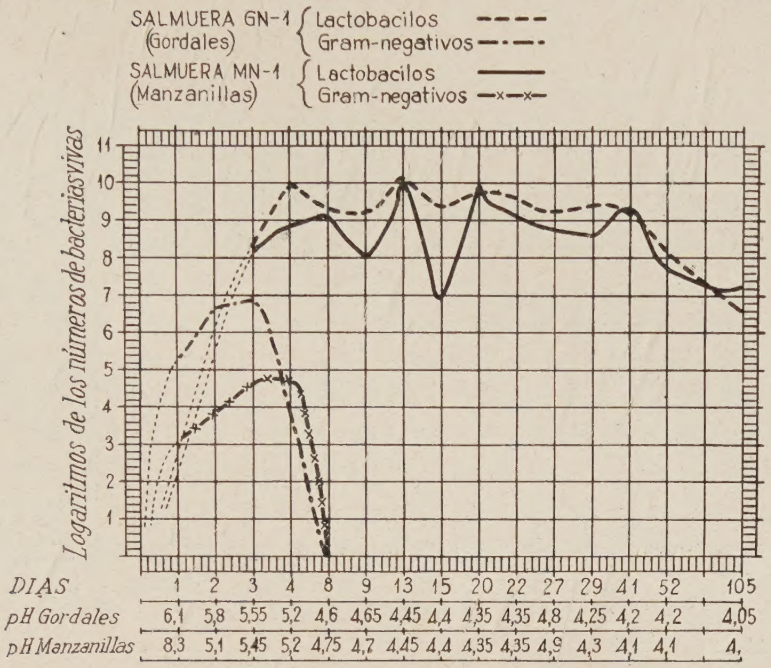



*Fig. 2.*

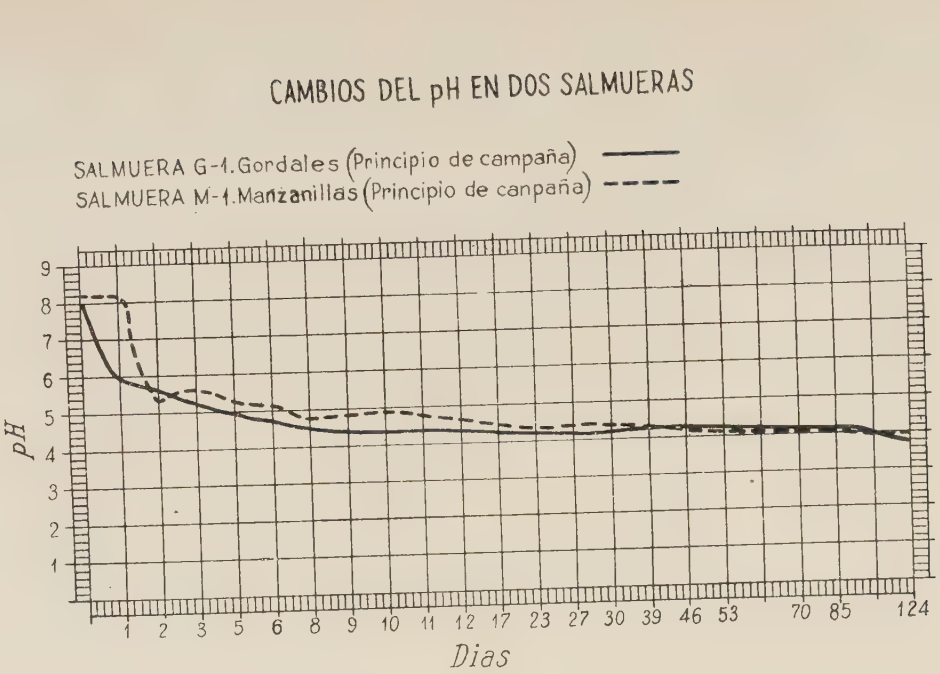

CAMBIOS DEL pH EN DOS SALMUERAS
SALMUERA G-1. Gordales (Principio de campaña)
SALMUERA M-1. Manzanillas (Principio de campaña)
pH
9
8
7
6
5
4
3
2
1
1 2 3 5 6 8 9 10 11 12 17 23 27 30 39 46 53 70 85 124
Dias

*Fig. 3.*

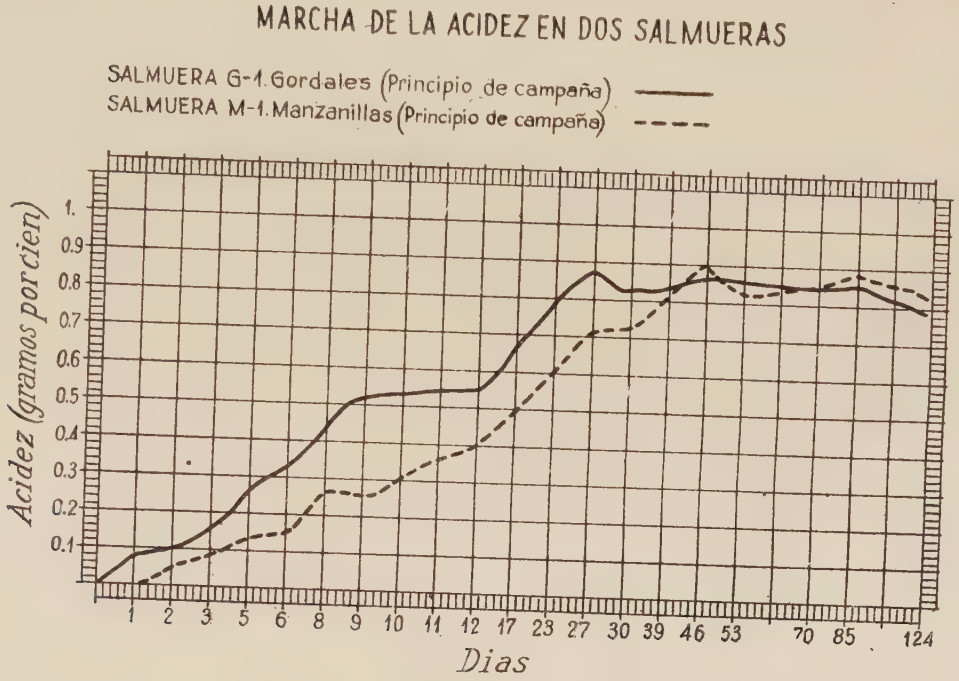

MARCHA DE LA ACIDEZ EN DOS SALMUERAS
SALMUERA G-1. Gordales (Principio de campaña)
SALMUERA M-1. Manzanillas (Principio de campaña)
Acidez (gramos por cien)
1.
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
1 2 3 5 6 8 9 10 11 12 17 23 27 30 39 46 53 70 85 124
Dias

*Fig. 4.*

## CONSECUENCIAS Y DEDUCCIONES

El examen detenido, tanto de los cuadros como de las gráficas, nos lleva a hacer algunas consideraciones acerca de la evolución que experimenta la población microbiana de las salmueras.

Primeramente puede verse que no existen diferencias de importancia entre las salmueras de principio y fin de campaña.

Las bacterias Gram-negativas comienzan a desarrollarse en los primeros días rápidamente, alcanzando su máximo hacia el tercer día, para decrecer hacia el sexto día en las manzanillas, y hacia el noveno en las gordales; el número de las mismas es constantemente más alto en las gordales que en las manzanillas. En las salmueras de fin de campaña se observa lo mismo, si bien parece que los números tienen tendencia a ser más altos y en las manzanillas persiste hacia el cuarto día, para descender bruscamente. La desaparición de estas bacterias coincide, en general, con pH alrededor de 4,5.

Paralelamente se van desarrollando y multiplicando los Lactobacillus conforme las condiciones del medio le van siendo óptimas. En las salmueras tiene lugar un rápido descenso inicial del pH, debido a la salida de ácidos orgánicos de las aceitunas, formados en su mayoría durante el cocido y los lavados; este descenso hace posible la multiplicación de los bacilos lácticos. Experiencias realizadas por nosotros y aún no completados nos han permitido observar que, en medios con el 7 por 100 de ClNa y pH neutro, los lactobacilos son incapaces de desarrollarse, haciéndolo inmediatamente en cuanto se baja el pH a 5; esto es precisamente lo que ocurre en las salmueras de aceitunas. Así, pues, al segundo día de iniciado el proceso aparecen los Lactobacillus en números ya relativamente altos, coexistiendo con los Gram-negativos; en días sucesivos los bacilos lácticos van en aumento, en tanto que los otros disminuyen hasta desaparecer; quedan, pues, al final como casi únicos pobladores de la salmuera los Lactobacillus. La aparición de colonias de estos en las placas al sembrar salmueras de dos días hace suponer que en el período anterior han sufrido una fase de multiplicación rápida tras un período de latencia; no se han realizado aún investigaciones sobre estos estadios iniciales de la salmuera. Respecto a la evolución de la población de lactobacilos en las salmueras, los recuentos nos permiten observar que sufre oscilaciones con altibajos, pero con una tendencia marcada a aumen-

tar hasta los doce-trece días, para estabilizarse después o descender muy lentamente. Dichas oscilaciones pueden obedecer a variaciones en el material fermentativo de que dispongan, sin excluir la posibilidad de que las muestras se hayan tomado de distintas zonas del bocoy; pero no deja de tener alguna significación que los números máximos se alcancen hacia el mismo tiempo en todas las salmueras estudiadas. En las de principio de campaña los números comienzan siendo mayores en las gordales, para descender después e igualarse con las manzanillas, siendo al doceavo día más alto el número alcanzado en las salmueras de manzanillas. Parecida marcha siguen las de final de campaña, si bien parecen menores en éstas las oscilaciones de la población en las gordales.

Se han hecho determinaciones y recuentos en salmueras de ocho meses, encontrándose cifras de 51.000.000 en las gordales y de 84.000.000 en las manzanillas; así, pues, se ve que el número de bacterias lácticas vivas de la salmuera se mantiene durante mucho tiempo relativamente estabilizado, si bien más bajo que durante los días de máxima, que son los doce-trece primeros, con altibajos debidos también, muy probablemente, a oscilaciones de la temperatura del ambiente. Así, pues, no conviene olvidar que las cifras últimas de los cuadros (ciento cinco-ciento veinticuatro días) corresponden a salmueras en el mes de enero, en tanto que las cifras consignadas más arriba para salmueras de ocho meses se han obtenido en el mes de junio.

Análogamente al estudio realizado anteriormente (1) se han aislado colonias y se han clasificado numerosas cepas, llegándose a reforzar los resultados de nuestro trabajo anterior:

1. Las bacterias Gram-negativas aisladas corresponden al género *Aerobacter*, siendo la más abundante *A. cloacae* y mucho menos *A. aerógenes*.

2. La especie causante de la fermentación, aislada reiteradamente, ha sido *Lactobacillus plantarum*.

3. Siguen sin encontrarse *Lactobacillus* heterofermentativos; de unas salmueras procedentes de Alcalá de Guadaira se han aislado, en cambio, varias cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.

4. En las primeras fases, así como en diversas salmueras deterioradas, se aislan también especies esporógenas del género *Bacillus*, que requerirán un detenido estudio ulterior.

5. Con los *Lactobacillus* coexisten diversas levaduras, de las

que se han aislado cuatro o cinco tipos diferentes. Su número en salmueras de ocho meses se ha evaluado en 10.500.000 por c. c. para las gordales y 3.500.000 por c. c. para las manzanillas.

Respecto a los períodos o estàdios del proceso fermentativo, en los cuadros I y II quedan delimitados los tres que hemos llamado primario, intermediario y final, dándose su característica en la casilla de especies predominantes. Se refuerza también nuestra conclusión del trabajo anterior respecto a la mayor rapidez de la fermentación con relación a los estudios efectuados en California.

## RESUMEN

Se hace un estudio cuantitativo, por el método de recuento en placas, de las poblaciones microbianas que se desarrollan en las salmueras de aceitunas. Los bacilos Gram-negativos alcanzan un máximo de 400.000 por c. c. a los tres días, decreciendo rápidamente hasta desaparecer. Los Lactobacilos se desarrollan al principio lentamente, para alcanzar números elevadísimos a los doce-quince días, decreciendo después y estabilizándose su número en unos 51-84 millones por c. c. Se hacen consideraciones sobre la naturaleza de los microorganismos y sobre los diferentes períodos del proceso fermentativo, ofreciéndose cuadros con los números de las poblaciones microbianas y gráficas demostrativas de su evolución.

## BIBLIOGRAFIA

(1) **IZQUIERDO TAMAYO, Antonio.**—1953. Fermentación microbiana en el aderezo de las aceitunas verdes. **Microbiología Española.** Vol. 6, núm. 4, págs. 291-306.

(2) **IZQUIERDO TAMAYO, Antonio.**—1953. Microbiology of Spanish-type green olives. (Comunicación presentada al VI Congreso Internacional de Microbiología. Roma. Septiembre 1953.)

(3) **R. DE LA BORBOLLA (J. M.), C. GOMEZ HERRERA, SRTAS. R. GUZMAN Y R. VAZQUEZ.**—1952. Estudios sobre aderezo de aceitunas verdes. VII. Efectos del tratamiento con lejía. **Anales de la R. Soc. Españ. de Fís. y Quím.** Serie B. Química.

*C. S. I. C.*
*INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA*
*SECCION DE VIRUS*

# OBTENCION DE ANTIGENOS Y SUEROS HIPERINMUNES DE LAS ENCEFALITIS DE SAN LUIS, JAPONESA B, EQUINAS ESTE Y OESTE Y ENSAYOS DE FIJACION DE COMPLEMENTO CON LOS MISMOS. I (*)

por
A. P. García Gancedo

## ESTUDIO PRELIMINAR

A partir del año 1930 se han ido descubriendo tan crecido número de infecciones humanas y animales producidas por virus neurotropos, que han inducido a los investigadores a buscar los procedimientos más fáciles, rápidos y seguros, para establecer el posible diagnóstico etiológico de estas infecciones. Leake ha sugerido, que este importante grupo de enfermedades sea diagnosticado como «encefalitis infecciosa» hasta que el virus responsable haya sido identificado en el curso de estudios experimentales en laboratorios especializados.

El llegar a establecer un diagnóstico diferencial entre las diversas encefalitis producidas por virus, tanto desde el punto de vista sintomatológico (clínico), como por las aportaciones suministradas por los laboratorios corrientes, es virtualmente imposible dada la muy limitada reacción del tejido del sistema nervioso central a los procesos inflamatorios. Sin embargo, es indudable que existen ciertas diferencias respecto a localización de las lesiones, extensión del proceso y ritmo de progresión, que pueden servir para distinguir ciertas infecciones producidas por un deter-

(*) Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. E. Gallardo, Jefe de la Sección de Virus.

minado virus de las originadas por otros. La poliomielitis, por ejemplo, suele afectar generalmente las astas anteriores de la medula, y con menos frecuencia los núcleos del cerebro o de la corteza, como se observa en en cierta proporción en los casos paralíticos; el virus de la rabia tiene poca afinidad por las células de las meninges periféricas y se encuentra rara vez en el líquido cefalorraquídeo; la encefalitis de tipo Ruso, además de provocar manifestaciones de suma gravedad, determina frecuentemente una parálisis fláccida del cinturón escapular. Los informes de laboratorio demuestran, que en todas estas afecciones el número total de células en el líquido cefalorraquídeo suele ser generalmente de 25 a 500, y en ciertos casos, normal o de más de 2.000. En los primeros días de la enfermedad predominan las células polimorfonucleares, que son reemplazadas más adelante por un gran número de linfocitos, observándose también frecuentemente monocitos en la proporción del 5 al 20 por 100. Algunos investigadores (Adamson y Dubo), establecen un diagnóstico eventual entre la poliomielitis y las encefalitis equinas, por la presencia de los monocitos. Sin embargo, Hammon afirma que estas células pueden presentarse también en los porcentajes señalados tanto en la poliomielitis como en la meningitis tuberculosa. La presión del líquido puede ser normal o elevada, la glucosa y los cloruros, generalmente normales, y las globulinas normales o ligeramente elevadas.

El estudio histopatológico en los casos mortales puede resolver el diagnóstico diferencial en la rabia, por el hallazgo de los cuerpos de Negri, y en la poliomielitis, por el tipo y distribución de las lesiones; mas no aclara el diagnóstico en los de encefalitis tipo San Luis y equina Oeste, pues en ambas se observan lesiones diseminadas en los núcleos cerebrales, sin participación alguna de la medula.

Se cuenta también con datos anamnésicos y epidemiológicos de gran valor; una mordedura por un perro en los casos de rabia, una parotiditis epidémica, sarampión, varicela, etc., en las encefalitis postinfecciosas, o una vacunación antivariólica en la encefalitis postvacunal. Si la enfermedad se presenta durante el verano, se determinará si el enfermo visitó o vivió en algún foco conocido de encefalitis humana o equina, y si fué picado por mosquitos o garrapatas; en los casos que aparezcan durante el invierno, se determinará si el domicilio del enfermo está infectado de ratones, ya que, como es sabido, la coriomeningitis leucocitaria se registra pocas veces en verano y suele darse en personas que habitan

viviendas en las que existen gran número de ratones. Vemos pues, que un interrogatorio minucioso, enfocado desde el punto de vista epidemiológico, puede dar cierta información respecto al probable agente etiológico, a veces más completa que un examen clínico detenido.

## Pruebas en laboratorios especializados.

Las únicas prácticas y específicas que pueden hacerse en el vivo son las serológicas de neutralización y las de fijación de complemento. Para ambas se precisan dos muestras estériles de suero, tomada una durante los siete primeros días de enfermedad y la otra diez días o tres semanas después de la primera. De registrarse reacciones negativas con los sueros de la segunda toma, ello significa que la enfermedad en cuestión no ha sido causada probablemente por el virus con el cual se verificó la reacción serológica. En las epidemias en que se den casos de pacientes o grupos de los mismos cuyas sangres no protejan contra los virus conocidos, habrá que pensar en otros agentes etiológicos no aislados o bien en casos de poliomielitis, enfermedad que como es sabido no puede ser diagnosticada directamente por métodos serológicos.

Las sangres deben ser extraídas con las más rigurosas precauciones asépticas y todo el material utilizado, agujas, jeringas, tubos y tapones, esterilizado en la autoclave o en seco. Para las pruebas de neutralización es preferible la sangre total sin anticoagulantes ni medios conservadores, pero de tenerse que hacer la remisión a distancia, se utilizará el suero adicionado de borato fenicado de mercurio hasta una concentración de 1/50.000, dosis que no perjudica a las experiencias de neutralización ni a las de fijación de complemento.

Una determinación completa de neutralización, requiere de diez a quince días y muchos más cuando se realizan titulaciones comparativas.

La reacción de fijación de complemento es indiscutiblemente la de más fácil y rápida realización, pero seguirá limitada su aplicación a la clínica, en tanto no pueda efectuarse en laboratorios de tipo general. En la actualidad, la preparación de antígenos y antisueros positivos para ensayos de control es demasiado especializada para ser llevada a cabo en los laboratorios corrientes.

La mayoría de los procesos encefálicos producidos por virus se dan en

animales vertebrados salvajes y domésticos, siendo en las aves donde reside el principal reservorio de virus, de donde por intermedio de artrópodos hematófagos (mosquitos, garrapatas, piojos, etc.) son transmitidos a nuevos animales o al hombre, cerrándose así la cadena epidemiológica. Dentro de este importante grupo están incluídos los virus de las encefalitis de San Luis, Joponesa B, Rusa y los de las equinas Este, Oeste, Venezolana y California; y como probables pertenecientes al mismo, los del Nilo Occidental, Forestal de Semliki y Fiebre Bwamba. Otros muchos virus con afinidades neurotropas se han ido aislando en los últimos años. En 1944, Roca-García aisla de mosquitos capturados en América del Sur, los denominados Anopheles H, Anopheles B y Wyeomya, cuyas posibles relaciones con infecciones del hombre son hasta ahora desconocidas. En 1946, Smithburn, Haddow y Mahaffy, mediante la inoculación de un triturado filtrado de Aedes infectados, en Macacus Rhesus, aisla el llamado Bunyamvera Virus, adaptándolo al ratón. Por este virus no se han podido comprobar enfermedades aparentes en el hombre ni en animales inferiores en condiciones naturales, pero es indudable que se producen infecciones inaparentes en el hombre, que se revelan por el hecho de haberse encontrado en los sueros de residentes de Uganda anticuerpos neutralizantes.

De los dieciocho virus aislados por el personal de la División Internacional de la Salud en artrópodos de las selvas de Africa Oriental y Occidental, Brasil y Colombia, la gran mayoría siguen en estudio en los laboratorios de la Fundación Rockefeller de Nueva York, y considerados hoy como «agentes desconocidos de enfermedades desconocidas».

Son igualmente neurotropos el llamado virus B, transmitido al hombre por mordedura de monos, el de la coriomeningitis linfocitaria, de posible transmisión por el polvo impregnado por excretas de roedores (ratón doméstico), los de la meningoencefalitis hemorrágica focal y Seudocoriomeningitis de forma de transmisión desconocida, y el de la Encefalomielitis ovina (Louping-ill), enfermedad de las ovejas, de la que se han dado casos humanos accidentales en investigadores que trabajaban con este virus. Casals en 1944 dió a conocer las estrechas relaciones serológicas entre el Louping-ill y la encefalitis Rusa, y un año después, Silber y Shubladze comunicaron la presencia del Louping-ill en la Rusia Blanca, no sólo en las ovejas, sino también en el hombre. Ello representa una observación extraña, pues en Escocia no se ha observado ningún caso humano,

a pesar de tratarse de una enfermedad enzoótica y epizoótica en dicho país desde hace muchos años.

## MATERIAL, VIRUS Y ANIMALES UTILIZADOS

Los cerebros de los ratones infectados experimentalmente, constituyen hasta ahora el material básico para la elaboración de los antígenos, y ellos fueron desde luego los utilizados por nosotros.

Se partió de los siguientes virus: San Luis, estirpe Webster, aislada por el Dr. L. T. Webster de un cerebro humano; Japonés B, estirpe conocida como Nakayama; equino Este, estirpe aislada en la epidemia de Nueva Jersey en el año 1933 de un caso fatal humano, y equino Oeste, estirpe aislada por el Dr. B. Howitt de un cerebro de caballo en California. Estas cuatro estirpes proceden de la Universidad de California, laboratorios de la Fundación Hooper, donde le fueron amablemente cedidos al Dr. E. Gallardo en 1948.

**Animales.**—Para la preparación de antígenos utilizamos ratones blancos de cuatro a cinco semanas; para la obtención de sueros hiperinmunes, cobayos machos, y para una prueba previa de receptividad comparada de virus: ratones, cobayos, conejos y embriones de pollo. (Véase cuadro.)

## METODOS

### Técnica de la inoculación intracerebral en el ratón.

Es indispensable para inyectar intracerebralmente al ratón, mantener a éste en completa inmovilidad durante la operación. Para ello previamente se anestesia ligeramente al animal con éter. Para hacer la inoculación se le sujeta con la mano izquierda de la siguiente forma: con el pulgar y el índice se le coge por la piel detrás de las orejas, pasando el cuerpo por el hueco de la mano y sujetando el rabo con el dedo meñique. Se desinfecta con alcohol la parte superior de la cabeza y se atraviesa verticalmente con la aguja la piel y el hueso, hasta llegar a la masa encefálica. Entonces se inyecta el líquido lentamente.

SUSCEPTIBILIDAD COMPARADA DE ALGUNOS ANIMALES DE LABORATORIO ANTE LAS ESTIRPES UTILIZADAS

| Animales | Ratones de 4 a 5 semanas | | Cobayas de 250 a 300 gs. | | Conejos de 1.400-1.800 gs. | | Embriones de pollo de 8 a 10 días |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Virus | Intrac. | Intrap. | Intrap. | Intrac. | Intrac. | Intrap. | |
| San Luis ... ... | + + + + | + + | + + | + | 0 | 0 | ± |
| Japonés B ... ... | + + + + | + + | 0 | 0 | 0 | 0 | ± |
| Equino Este ... | + + + + | + + + | + + + + | + + + | + + + | ± | + + + + |
| Equino Oeste .. | + + + + | + + | + + + + | + + | + + + | ± | + + + + |

+ + + + = Mueren todos.
+ + + = " 75 %
+ + = " 50 %
+ = " 25 %
± = " alguno.
0 = No mueren.

Cualquier movimiento en el momento de la inyección causa la muerte del animal.

**Técnica de la inoculación intracerebral en el cobayo.**

Es necesario, como en el caso anterior, mantener el animal inmóvil. Para ello se le sujeta por las patas a una bandeja y se le anestesia ligeramente. Después se depila la parte superior de la cabeza arrancando el pelo con los dedos, desinfectando a renglón seguido la zona depilada. Entonces con un trépano se abre un orificio e inmediatamente se clava la aguja vertical en el cerebro, inyectando el líquido con lentitud.

**Técnica de la inoculación intraperitoneal en el cobayo.**

En términos generales es aconsejable utilizar animales machos de peso medio (300 a 400 grs.), a los que es conveniente tomar la temperatura rectal durante cuatro o seis días, con objeto de excluir una posible infección secundaria de los animales que sea causa de error en el trabajo emprendido.

Sujeto el cobayo por un ayudante, se introduce la aguja en un trayecto subcutáneo de 1 ó 2 cm. aproximadamente, y luego se atraviesan perpendicularmente los músculos de la pared abdominal, introduciendo la aguja otro centímetro en dicha dirección, sin el menor temor a perforar el intestino, inyectando seguidamente el contenido de la jeringa.

El lugar de la inoculación estará depilado en una extensión aproximada de 4 a 6 cm., bastando para esto, arrancar con los dedos los pelos en la zona de piel correspondiente.

La inyección debe ir precedida y seguida de frotamiento con tintura de yodo y alcohol en la zona de punción.

**Temperatura y curva febril.**

Después de inoculados los cobayos, deben ser sometidos al control termométrico. A este propósito es necesario hacer las siguientes consideraciones:

En primer lugar, la temperatura del cobayo varía notablemente según

sea la del ambiente. Es preciso que estos animales estén en una habitación cuya temperatura se mantenga entre 20 y 23 grados C. aproximadamente. Temperatura ambiente inferior a este límite, provoca hipotermia en el cobayo, lo que significa dificultades en la interpretación de la curva térmica del mismo. Otro dato a tener en cuenta es, que la temperatura del cobayo cambia a lo largo del transcurso del día, razón por la que debe ser tomada siempre a la misma hora.

La temperatura normal del cobayo, en las condiciones ambientales expuestas, oscila entre 37,5 y 39,5 grados C. Cuando la temperatura ambiente es más alta o más baja que los valores ambientales expresados, se deja influenciar la temperatura del animal en los sentidos respectivos. Variaciones grandes de temperatura, como las que acontecen en laboratorios sin calefacción, acentúan las variaciones térmicas horarias.

Se considera como fiebre en el cobayo toda temperatura que se eleva por encima de 40 grados C. Este criterio se sigue en las escuelas de Zinsser y otros, en América del Norte, y también por la de Nicolle. En los laboratorios alemanes se toma como límite febril mínimo, la temperatura de 39,5 grados C.

El control térmico del cobayo requiere cierta práctica, pues es frecuente la perforación del intestino por maniobras mal conducidas. Es preciso sujetar el cobayo con la mano y el antebrazo izquierdo, apretándolo ligeramente contra el lado izquierdo del tórax del que mide la temperatura. Con la mano derecha se introduce el termómetro en dos tiempos: Primero, para atravesar el ano, y segundo, para penetrar en el recto unos 5 a 6 cm.

El termómetro que se utiliza para este animal es, sencillamente, el clínico ordinario, convenientemente desinfectado por antisépticos (lisol, zotal), lavado posterior en alcohol y, por último, vaselina o glicerina estéril como lubrificante.

La fiebre producida en el cobayo por una infección, varía según el virus utilizado.

Cuando se inyectan por vía intraperitoneal 4 ó 5 c. c. de sangre en el cobayo, no suele provocarse, en general, elevación febril precoz por absorción de proteínas. La fiebre se inicia, según el virus, del cuarto al octavo día y tiene carácter continuo. Rara vez remite uno o dos días, siendo sus características más acusadas la continuidad. Curvas febriles irregulares denotan casi siempre, o mala técnica en la toma de la temperatura, o infecciones de los animales, extrañas en absoluto al virus inoculado.

Obtenida en uno o varios cobayos inoculados la curva febril típica o sospechosa del virus inoculado, los animales correspondientes a este lote deben ser separados en dos grupos. Los de uno serán sacrificados con la doble finalidad de realizar una autopsia general y recoger los órganos que nos interesen (cerebro, bazo, testículos, pulmones, etc.). El segundo grupo de animales, en el que se incluirán también los que no hayan tenido fiebre, servirá para las pruebas de inmunidad.

### Autopsia.

Para estudiar las lesiones anatomopatológicas, así como para recoger el material que interesa para comprobar si la enfermedad es transmisible al cobayo por pases sucesivos, es preciso el sacrificio del animal y la autopsia del mismo. Para sacrificarle se coloca debajo de un cristalizador o campana, en la que se asfixiará por la introducción de gas de alumbrado. Muerto el animal, se sumerge en una solución de zotal o lisol al 5 por 100, con el fin de destruir los gérmenes y parásitos de los pelos y piel; esto es imprescindible para efectuar la autopsia asépticamente.

La técnica más empleada es como sigue: El cobayo se fija sobre una plancha de corcho mediante unos alfileres de cabeza redonda, con los que se atravesarán las plantas de sus patas. La plancha de corcho debe estar cubierta por un paño mojado en un antiséptico (zotal, lisol). Una vez así dispuesto el animal, se procede a cortar la piel del abdomen y tórax, comenzando en las regiones inguinales. A continuación se despegará la piel cortada, de los planos subyacentes, mediante un estiramiento de la misma en dirección a la cabeza.

Separada la piel, se procederá a la apertura de las cavidades abdominal y torácica. El abdomen se abrirá de la siguiente forma: Con pinzas y tijeras se hace un ojal en la parte central del mismo, que se continuará hasta el apéndice xifoides. La presencia o ausencia de exudados podrá así observarse y, si es preciso, hacer recogida de los mismos para su estudio. Después se continuará la incisión hasta el pubis. Finalmente, otro corte crucial y medio, permitirá el levantamiento de los colgajos y apertura completa del abdomen.

El tórax se pondrá al descubierto levantando todo el peto externo-

costal mediante dos cortes laterales con tijeras y corte de las inserciones anteriores del diafragma.

A continuación se procede a la apertura del cráneo para la extracción de la masa encefálica. Para ello se cambia de posición al animal, colocándole en decúbito prono y fijándole como anteriormente. La inmovilidad de la cabeza nos la dará un alfiler clavado en el labio superior. La craneotomía se hará en la siguiente forma: La piel se incide desde la parte central de la raíz del cuello hasta el arranque de las extremidades anteriores. Luego se hará un corte sagital hasta el hocico. Fnalmente, se procederá al despegamiento de los dos colgajos resultantes, con pinzas y tijeras, llegando lo más posible hasta los conductos auditivos y ojos. Queda así al descubierto toda la calota ósea, la cual antes de abrirse debe ser flameada ligeramente con mechero de gas o con algo de alcohol, para destruir los gérmenes accidentalmente llevados a la región durante la separación de la piel.

Para efectuar la apertura de la cavidad craneal, se fija ésta mediante forceps o pinzas con dientes de ratón adaptables a las órbitas, con la mano izquierda, y con la derecha se corta la bóveda valiéndose de una cizalla o de tijera curva resistente, formando un ángulo que teniendo como vértice el occipucio, llegue a ambos agujeros auditivos. Dos cortes laterales complementarios hechos con el mismo instrumento terminan por abrir la totalidad de la calota, dejando al descubierto la masa encefálica. La extracción del cerebro y cerebelo se realiza con las ramas de unas tijeras curvas cerradas o con una cucharilla, ayudándose con pinzas.

Las técnicas descritas pueden ser aplicadas a la mayoría de los animales de laboratorio, con tan sólo la variación del instrumental, más o menos resistente, según el animal.

### Pases en ratón.

Se realizan preparando suspensiones del virus en la concentración adecuada para cada cepa, como más adelante se indica en la parte experimental. Se inocula asépticamente, previa anestesia con éter, por vía intracerebral, con 0,03 c. c. de suspensión por ratón. Cuando éstos presen-

tan parálisis se sacrifican sangrando a muerte, realizándose la extracción de los cerebros asépticamente.

Cada cerebro se coloca en un frasco de boca ancha estéril, de tapón esmerilado provisto de algunas perlas de vidrio, las cuales al agitarse disgregan el cerebro. Se agrega después caldo común en cantidad suficien-

*Inoculado con encefalitis de San Luis para obtener suero hiperinmune. Cobayo 3.º Pauta 3.ª*

te para que quede al 10 por 100. Se hacen siembras de esta emulsión en tubos de caldo común y de éstos se resiembra en agar inclinado para observar si existe contaminación bacteriana en dicha emulsión de cerebro. Si está pura se conserva a —20 grados hasta su posterior liofilización.

Los ratones deben observarse cuidadosamente varias veces al día, para evitar que mueran y sean devorados por los demás. Cuando están atacados presentan pelo erizado, rigidez en el rabo, parálisis de las extremidades y convulsiones. También excitación y movimientos giratorios característicos.

Hemos observado que utilizando ratones jóvenes son sensibles todos

a los cuatro virus. Que la cantidad de suspensión de virus más apropiada para la inoculación intracerebral es de 0,03 c. c. por ratón. Que las suspensiones óptimas de material virulento para la inoculación son:

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Encefalitis de San Luis: | Suspensión | 1/10 | presentando | parálisis | a | los | 5 | a | 7 | días |
| " Japonesa B: | " | 1/10 | " | " | " | " | 6 | " | 8 | " |
| " equina Este: | " | 1/10.000 | " | " | " | " | 3 | " | 4 | " |
| " " Oeste: | " | 1/1.000 | " | " | " | " | 4 | " | 5 | " |

Y que al cabo de un año el material virulento liofilizado mantiene su virulencia.

### Pases en cobayo.

En las encefalitis equinas Este y Oeste partimos de suspensión virulenta de cerebro de ratón, y después de varios tanteos, hasta llegar a la concentración adecuada del virus, conseguimos adaptar dichos virus a cobayo, obteniendo así suspensiones virulentas de cerebro de cobayo. Este material es el que se utilizó en las inoculaciones a estos animales.

En líneas generales se emplea el mismo método que en los pases en ratón, variando en algunos detalles, como son trepanación previa antes de inocular, y siendo la cantidad inoculada 0,10 ó 0,15 c. c.

También se hizo alguna inoculación por vía intraperitoneal.

Los cobayos atacados presentan temblor, babeo, debilidad y parálisis. Otro síntoma es la aparición de fiebre, debiéndose tomar diariamente la temperatura rectal profunda, introduciendo el termómetro clínico hasta la línea de 38 grados.

Los cobayos se observan dos veces al día, y si a los quince días no presentan síntomas de enfermedad se desechan.

Hemos observado que los cobayos jóvenes son sensibles a los dos virus mencionados. Que la cantidad de suspensión de virus más adecuada para la inoculación intracerebral es 0,10 ó 0,15 c. c. por cobayo.

Que las suspensiones óptimas de material virulento para la inoculación intracerebral son:

Encefalitis equina Este: Suspensión 1/10.000, presentando parálisis a los tres a cuatro días.

Encefalitis equina Oeste: Suspensión 1/1.000, presentando parálisis a los tres a cinco días.

Y que al cabo de un año el material virulento liofilizado mantiene su actividad.

En las encefalitis de San Luis y Japonesa B, para las experiencias en cobayo hemos partido siempre de suspensión virulenta de cerebro de ratón.

**Elementos necesarios para la reacción de fijación de complemento.**

Sangría de carnero.

Se recoge sangre de carnero asépticamente y se mezcla con un volumen igual de solución de Alserver's. La cantidad de sangre necesaria se lava tres veces en solución salina centrifugada cada vez, durante diez minutos, a 2.000 r. p. m., o cinco minutos a 4.000 r. p. m.

Solución modificada de Alserver's

| | |
|---|---|
| Glucosa ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... | 2,05 % |
| Cloruro sódico ... ... ... ... ... ... ... ... ... | 0,42 % |
| Citrato sódico ... ... ... ... ... ... ... ... ... | 0,80 % |
| Acido cítrico ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... | 0,055 % |
| Agua destilada ... ... ... ... ... ... ... ... ... | 100 c. c. |

Complemento.

Se sangran en corazón varios cobayos machos (4 ó 5), y la sangre se recoge por separado en tubos estériles, dejándola a la temperatura ambiente una hora y en la nevera veinticuatro horas. Los sueros resultantes de cada tubo se separan y se titulan, descartando aquellos que en la cantidad de 0,14 c. c. con 0,40 c. c. de células sensibilizadas, al ser colocados en baño maría a 37 grados C. durante una hora, no dan hemolisis total. Los sueros potentes se conservan en hielo seco o liofilizados.

Titulación del complemento.

Todos los reactivos deben conservarse fríos durante la prueba.

En un tubo se hace una dilución de complemento al 1/30 y en una gradilla se colocan ocho tubos con 0,05, 0,08, 0,10, 0,12, 0,14, 0,16, 0,18 y 0,20 c. c. de esta dilución. Después se añade la solución salina hasta completar el volumen de 0,60 c. c. Agitada la gradilla se coloca en

baño maría a 37 grados durante una hora, agregándose por último a cada tubo 0,40 c. c. de células sensibilizadas preparadas quince minutos antes de la reacción. (Véase el cuadro que se presenta como ejemplo.)

TITULACIÓN DEL COMPLEMENTO

| Tubos | Complemento | Sol. salina | Bañomaría una hora a 37° | Células sensibilizadas preparadas 15 minutos antes | Bañomaría media hora a 37° | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,05 c. c. | 0,55 c. c. | | 0,40 c. c. | | 2 |
| 2 | 0,08 " | 0,52 " | | " " | | 2 |
| 3 | 0,10 " | 0,50 " | | " " | | 1 |
| 4 | 0,12 " | 0,48 " | | " " | | 0 |
| 5 | 0,14 " | 0,46 " | | " " | | 0 |
| 6 | 0,16 " | 0,44 " | | " " | | 0 |
| 7 | 0,18 " | 0,42 " | | " " | | 0 |
| 8 | 0,20 " | 0,40 " | | " " | | 0 |

Dilución previa del complemento al 1/30.
0: hemolisis total.
4: no hay hemolisis.
3, 2, 1, ±: grados intermedios de hemolisis.
El título obtenido en este caso es 0,12, que significa que en 0,12 c. c. de complemento diluído al 1/30 hay una unidad de complemento.

El complemento se tituló siempre inmediatamente antes de su empleo.

Amboceptor hemolítico anticarnero (hemolisina).

Hay tres métodos de obtención:

Vía intravenosa.—Se utiliza un conejo blanco que pese alrededor de 2.700 grs. Se practican 10 inyecciones intravenosas de eritrocitos frescos de carnero (una diaria), lavados y diluídos al 1/2 en solución salina. Después se hace sangría de prueba diez días más tarde de la última inyección, y se titula. Si el suero tiene título alto se hace sangría total.

Vía peritoneal.—Se practican 3 ó 4 inyecciones intraperitoneales de eritrocitos frescos en las cantidades de 5, 10, 15 y 20 c. c., con intervalos de siete días .A la tercera inyección se hace una sangría de prueba diez días después. Si tiene alto título se hace sangría total, y de no ser así se pone la cuarta inyección y diez días después, sangría total.

Método mixto.—Consta de una primera inyección intraperitoneal de 5 c. c. de eritrocitos frescos; pasados siete días, tres inyecciones de

TITULACIÓN AMBOCEPTOR HEMOLÍTICO ANTICARNERO (HEMOLISINA) OBTENIDA EN NUESTRO LABORATORIO

| Tubos | Diluciones previas del amboceptor | Solución salina | Soluciones de amboceptor | Suspensión de eritrocitos 2 % | Complemento al 1/30 | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1/10 | 0,40 c. c. | 0,20 c. c. | 0,20 c. c. | 0,20 c. c. | 0 |
| 2 | 1/20 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 3 | 1/40 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 4 | 1/80 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 5 | 1/100 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 6 | 1/200 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 7 | 1/400 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 8 | 1/800 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 9 | 1/1000 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 10 | 1/2000 | | | | | 2 |
| | | | Testigos | | | |
| 1 | 1/10 | 0,60 c. c. | 0,20 c. c. | 0,20 c. c. | 0,0 c c | 4 |
| 2 | " | " " | 0,0 " | " " | 0,20 " | 4 |
| 3 | " | 0,80 " | " " | " " | 0,0 " | 4 |

El título se encuentra entre 1/1.000 y 1/2.000 y por ello hacemos otra titulación entre estos dos límites,

TITULACIÓN AMBOCEPTOR HEMOLÍTICO ANTICARNERO (HEMOLISINA) OBTENIDA EN NUESTRO LABORATORIO

| Tubos | Diluciones previas del amboceptor | Solución salina | Soluciones de amboceptor | Suspensión de eritrocitos 2 % | Complemento al 1/30 | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1/1000 | 0,40 c. c. | 0,20 c. c. | 0,20 c. c. | 0,20 c. c. | 0 |
| 2 | 1/1100 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 3 | 1/1200 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 4 | 1/1300 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 5 | 1/1400 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 6 | 1/1500 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 7 | 1/1600 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 8 | 1/1700 | " " | " " | " " | " " | 0 |
| 9 | 1/1800 | " " | " " | " " | " " | 1 |
| 10 | 1/1900 | " " | " " | " " | " " | 1 |
| 11 | 1/2000 | " " | " " | " " | " " | 2 |
| | | | | | | 2 |
| | | | Testigos | | | |
| 1 | 1/1000 | 0,60 c. c. | 0,20 c. c. | 0,20 c. c. | 0,0 c. c. | 4 |
| 2 | " | " " | 0,0 " | " " | 0,20 " | 4 |
| 3 | " | 0,80 " | " " | " " | 0,0 " | 4 |

El título es 1/1.600, lo cual quiere decir que 0,20 c. c. de solución de amboceptor al 1/1.600 contienen una unidad hemolítica.

1 a 2 c. c. en días consecutivos por vía endovenosa. Pasados diez días se hace una sangría de prueba y si el título es conveniente, sangría total. Se pueden poner dos nuevas inyecciones endovenosas en la misma dosis, o una peritoneal de 10 a 15 c. c. si el título resultase bajo.

El suero se conserva añadiendo un volumen igual de glicerina pura no ácida y estéril, o bien fenol purísimo en la cantidad corriente para los sueros, o borato de fenilmercurio en cantidad para que quede al 1/10.000.

Titulación del amboceptor hemolítico anticarnero.

Se preparan en 10 tubos las siguientes diluciones de amboceptor 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1.000 y 1/2.000, colocando en cada tubo 0,20 c. c. de cada dilución. A cada tubo se añaden 0,40 c. c. de solución salina, 0,20 c. c. de eritrocitos en dilución al 2 por 100, y 0,20 c. c. de complemento diluído al 1/30.

Al mismo tiempo se preparan tres tubos controles; el primero con 0,60 c. c. de solución salina, 0,20 c. c. de solución de amboceptor 1/10, 0,20 c. c. de suspensión de eritrocitos y sin complemento; el segundo con los mismos elementos que el anterior, pero en vez de amboceptor, complemento; y el tercero, sin amboceptor y sin complemento.

La unidad hemolítica será 0,20 c. c. de la dilución de amboceptor más alta, que hemolice totalmente 0, 20 c. c. de la suspensión de eritrocitos 2 por 100 en presencia de 0,20 c. c. de complemento diluído al 1/30, todo ello incubado en baño maría a 37 grados durante media hora.

Véase el cuadro que presentamos con la titulación de hemolisina obtenida por nosotros.

## OBTENCION DE SUEROS HIPERINMUNES

Se pueden conseguir de ratón, cobayo y hamster, mediante sucesivas inoculaciones por vía periférica de dosis crecientes de virus.

### Sueros hiperinmunes de ratón.

Se utilizan animales de cincuenta a sesenta días, en los que se inicia la inmunización con vacuna formolizada. La preparación de la vacuna se

efectúa triturando finamente en mortero, sin abrasivo, los cerebros virulentos de los distintos virus previamente pesados, a los que se añade lentamente solución salina formolizada al 1/2 por 100 en cantidad suficiente para que la suspensión quede al 10 por 100. Después de diez a quince días de permanencia en nevera, se comprueba la pérdida de su actividad patógena mediante inoculaciones intracerebrales en ratones jóvenes.

Pauta de inmunización: Los días primero y tercero, inoculaciones intraperitoneales de 0,25 c. c. de vacuna formolizada. Los días décimo, décimoquinto y vigésimo, inyecciones intraperitoneales de 0,50 c. c. de suspensiones de cerebros virulentos al 1/10.000, 1/100 y 1/100, respectivamente. Diez días después de la última inyección se sangran los ratones por puntura cardíaca, previa anestesia con éter. La sangre de los distintos ratones se centrifuga separadamente y los sueros colocados en tubos estériles se almacenan en nevera previa inactivación a 60° C. durante media hora.

### Sueros hiperinmunes de Hamster.

Adaptados los virus al hamster mediante inoculaciones intracerebrales en animales jóvenes, se comienza la inmunización con dos inyecciones intraperitoneales de 1 c. c. de vacuna homóloga formolizada en los días primero y tercero, y en los décimo, décimoquinto y vigésimo, inyecciones por la misma vía de 1 c. c. de suspensión virulenta de cerebro de hamster al 1 por 100.

### Sueros hiperinmunes de cobayo.

Se consiguen, bien siguiendo una técnica semejante a la utilizada en los de hamster, o bien inmunizando cobayos machos de 250 a 300 grs. de peso, mediante repetidas inyecciones intraperitoneales con intervalos de siete días, de suspensión de cerebro virulento de ratón del 1/10.000 al 1/100, en dosis de 1 a 4 c. c. Cuando los animales han recibido cuatro o seis inyecciones, se sangran por primera vez para determinar el

poder de los sueros, y si éstos son de título alto se practican sangrías totales. Los sueros, una vez inactivados a 56 grados C. durante media hora, se almacenan previa liofilización.

La mayoría de los investigadores son partidarios de utilizar el ratón blanco suizo para la obtención de los sueros hiperinmunes encefalíticos, por ser, como es sabido, este animal el más receptivo a los distintos virus. Las desventajas de este método son el requerir largo tiempo de inmunización para obtener títulos apropiados y la pequeña cantidad de suero conseguido por animal. Ante estos inconvenientes, Hammon y sus colaboradores, que vienen practicando varios cientos de ensayos al año, preparan los sueros hiperinmunes ateniéndose a las siguientes técnicas.

### Sueros equinos del Este y del Oeste.

Se inoculan subcutáneamente cobayos con 0,50 c. c. de suspensiones del 1/1.000 al 1/10.000 de cerebro infectado de cobayo, que suelen dar lugar en varios de los animales a parálisis no seguidas de muerte. Diez días después se inyectan 0,50 c. c. de la suspensión al 1/100 por vía intraperitoneal, y a los siete o diez días otra de 0,15 c. c. intracerebral de una suspensión al 1/10. Después de dos semanas se sangran los animales a muerte y los sueros, una vez inactivados, se mezclan, distribuyéndolo en ampollas pequeñas y se liofilizan, para evitar la rápida pérdida de título que se observa cuando se conservan en estado líquido a la temperatura de nevera.

### Sueros de San Luis, Japonés B, Nilo Oeste, Ruso y Hammon-Reeves, de California.

Después de unos cuantos pases en hamsters se liofilizan ampollas conteniendo suspensiones de cerebro al 1/10 y se almacenan a baja temperatura. De este stock se obtiene el material para inoculación de cobayos, a los que se hacen dos inoculaciones intracerebrales de 0,15 c. c. cada una, de suspensión de cerebro al 10 por 100, con intervalo de diez días. Generalmente los cobayos presentan fiebre después de

la primera inyección, pero rara vez se aprecian otros síntomas. Los animales se sangran diez o quince días después de la última inyección y el suero se conserva como en los virus equinos.

Estos sueros se han ensayado durante varios años con muchos tipos de antígenos de cerebro, sin haberse dado el caso de que hayan reaccionado con antígenos de cerebros de ratones normales.

Los sueros de San Luis y Japonés B suelen dar títulos del 1/256 al 1/512; los equinos del Oeste y de California, del 1/64 al 1/128, y el del Este, del 1/128 al 1/256, estando todos ellos dentro de los límites en que pueden usarse a diluciones altas como controles positivos o para la estandardización de los antígenos.

Usando este procedimiento para la obtención de sueros hiperinmunes, las diluciones óptimas (aquellas más altas de antígeno que dan el título más alto con el suero), no dan lugar a confusiones por superposición entre los antígenos ni tampoco por superposición entre sueros heterólogos sin diluir y los antígenos.

## Nuestro modo de proceder.

No pudiendo seguir, como era nuestro deseo, las pautas de Hammon, por carecer de hamsters para la adaptación de los virus de San Luis y Japonés B a tales animales y de ellos efectuar los pases a cobayos, y suponiendo que las pequeñas cantidades de suero de ratón que pudiésemos obtener con las pautas de Casals serían insuficientes para nuestros ensayos, nos decidimos a prescindir de las pautas clásicas y a ensayar la posibilidad de obtener en los cobayos, tanto los sueros hiperinmunes de las encefalitis de San Luis y Japonesa B como los equinos del Este y del Oeste. A ello nos indujo también el hecho experimental, comprobado por varios investigadores, de que los dos primeros virus referidos dan lugar en los cobayos a infecciones ligeras que se manifiestan en los sueros, por la formación de gran cantidad de anticuerpos neutralizantes, y el suponer que en tales sueros podrían hallarse igualmente pequeñas cantidades de anticuerpos fijadores del complemento. En cuanto a los del Este y del Oeste, esperábamos no encontrar grandes dificultades para la obtención de los sueros, ya que los cobayos son muy sensibles a los virus equinos.

### Encefalitis de San Luis.

Se obtienen seis sueros, habiendo ensayado cuatro pautas diferentes.

Con la primera, conseguimos el suero 1; con la segunda, el 2; con la tercera, el 3 y el 4; y con la cuarta, el 5 y el 6. El suero 3 se obtuvo antes de terminar la pauta de inmunización, por encontrarse el animal a los diez días de la inoculación intracerebral, en fase paralítica y en estado preagónico.

La temperatura rectal profunda en los cobayos rebasó los 40° C. después de las inoculaciones intracerebrales, apreciándose tan sólo un ligero aumento después de las intraperitoneales.

### Encefalitis Japonesa B.

Se obtienen once sueros, siguiendo las mismas pautas y verificándose las inoculaciones en las mismas fechas que en la encefalitis de San Luis.

Con la primera se obtienen los sueros 1 y 2; con la segunda, el 3 y el 4; con la tercera, el 7, 8 y 9, y con la cuarta, el 10 y 11. Los sueros 5 y 6 proceden de una segunda sangría realizada treinta y ocho días después de la primera, en los cobayos correspondientes a los sueros 3 y 4.

Las temperaturas observadas después de las inoculaciones, fueron semejantes a las obtenidas en la encefalitis de San Luis.

De estas experiencias, destaca notablemente el hecho, de que habiéndose efectuado los ensayos de inmunización al mismo tiempo y con las mismas pautas, en los correspondientes a la encefalitis Japonesa B, sólo muere un cobayo de los diez inoculados, en tanto que en los de la encefalitis de San Luis, de los trece animales inoculados, cinco mueren a las veinticuatro horas de la inoculación intracerebral; uno inoculado por la misma vía, se sacrifica a los diez días, paralítico y preagónico; uno muere a los seis días de la segunda inyección intraperitoneal, con caída del pelo en los costados (posibles trastornos tróficos); uno se sacrifica a los siete días de la cuarta inyección intraperitoneal en fase agónica; y tan sólo cuatro animales llegan al final de la experiencia sin anormalidades apreciables.

Esta patogenicidad del virus de la encefalitis de San Luis para el cobayo no ha sido citada, que nosotros sepamos, en los trabajos de los investigadores dedicados a estos estudios, razón por la cual consideramos oportuno consignar nuestras observaciones por si pueden servir para ulteriores experiencias.

### Encefalitis equina Este.

Debido a la gran actividad patógena de este virus, hemos encontrado algunas dificultades hasta llegar a determinar las dosis no letales.

En la obtención de diez sueros se ensayaron seis pautas diferentes: el suero 1 se obtiene por la pauta segunda; el 2, por la pauta tercera; el 4 y el 5, por la cuarta; el 6 y el 7, por la quinta, y el 10, por la sexta. El suero 3 procede de una segunda inmunización del cobayo que proporcionó el suero 2; y el suero 8, del mismo animal que proporcionó los sueros 2 y 3, sangrado ciento once días después de conseguir el suero 3. El suero 9 procede de una segunda inmunización realizada en el cobayo del que se obtuvo el suero 7.

### Encefalitis equina Oeste.

De los ocho sueros que se obtienen, el 1, 2, 3 y 4 lo fueron con la misma pauta; el 5 y 6 proceden de los cobayos que originaron los sueros 3 y 4 después de dos nuevas inyecciones intraperitoneales, y el 7 y 8 de los mismos animales con otras dos inyecciones intraperitoneales.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 1.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.
Animales utilizados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | Intracerebral. Suspensión del virus | Cantidad | 1.ª intraperit. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª intraperit. Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 500 | 1/10 | 0,15 c. c. | 0 | 0 | 0 | 0 | Muere a las 24 horas. |
| 2.º | 485 | 1/10 | 0,15 | 1/10 | 0,50 c. c. | 1/10 | 1 c. c. | Sangría a los 15 días. Suero n.º 1. |
| 3.º | 520 | 1/10 | 0,15 | 0 | 0 | 0 | 0 | Muere a las 24 horas. |
| 4.º | 620 | 1/10 | 0,15 | 1/10 | 0,50 | 1/10 | 1 | Muere a los 6 días. |

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 2.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.
Animales utilizados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | Intracerebral. Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|
| 1.º | 570 | 1/10 | 0,20 c. c. | Sangría a los 15 días. Suero n.º 2. |
| 2.º | 710 | 1/10 | 0,20 " | Muere a las 24 horas. |
| 3.º | 565 | 1/10 | 0,20 " | Muere a las 24 horas. |

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 3.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.

Animales utilizados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | Intracerebral. Suspensión del virus | Cantidad | 1.ª Intraperit. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intraperit. Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 500 | 1/10 | 0,15 c.c. | 0 | 0 | 0 | 0 | Muere a las 24 horas. |
| 2.º | 550 | 1/10 | 0,15 | 1/10 | 1 c. c. | 1/10 | 2 c. c. | Sangría a los 15 días. Suero n.º 4. |
| 3.º | 530 | 1/10 | 0,15 | 0 | 0 | 0 | 0 | Sangría a los 10 días. Suero n.º 3 y cerebro. |

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 4.ª

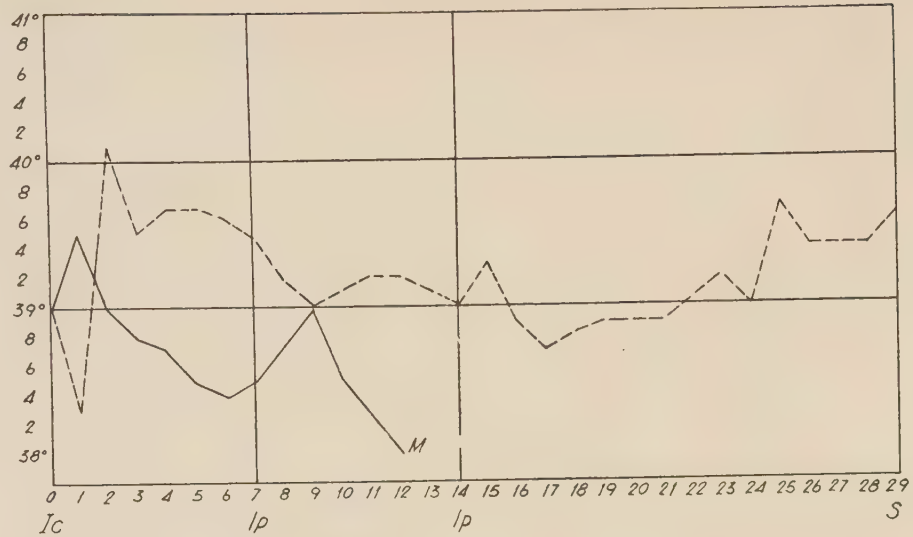
Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.

Animales utilizados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | Vía de inoculación intraperitoneal | Dilución | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 630 | 1.ª, 2.ª, 3.ª, 4.ª, 5.ª | 1/100 | 4 c. c. | Sangría a los 15 días. Suero n.º 5. |
| 2.º | 410 | 1.ª, 2.ª, 3.ª, 4.ª, 5.ª | 1/100 | 4 " | Sangría a los 15 días. Suero n.º 6. |
| 3.º | 540 | 1.ª, 2.ª, 3.ª, 4.ª | 1/100 | 4 " | Sacrificado a los 7 días. Extracción del cerebro. |

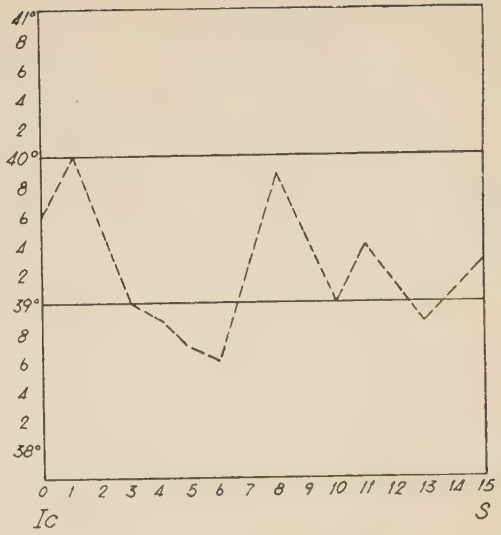
Temperaturas de los cobayos.

PAUTA 1.ª




Cobayo 2.º: ---------- Suero 1.
" 4.º: ————————

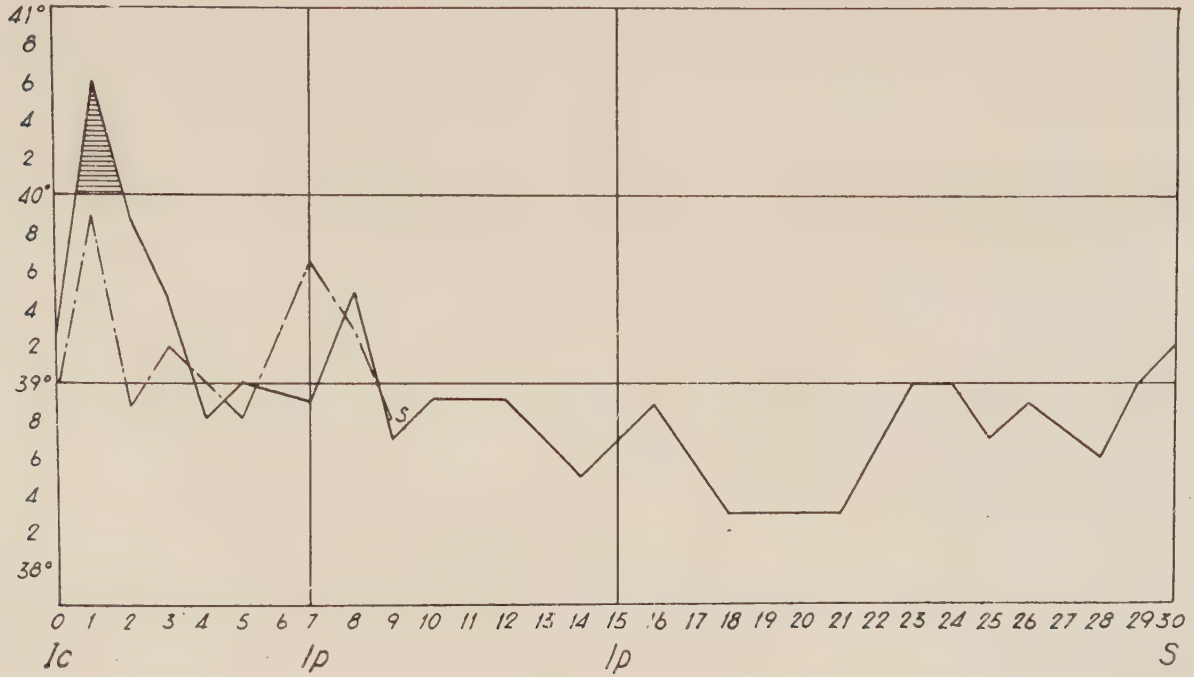
PAUTA 2.ª




Cobayo 1.º: ---------- Suero 2.

Ic: Inoculación intracerebral.
Ip: " intraperitoneal.
M: Muerto.
S: Sangría.

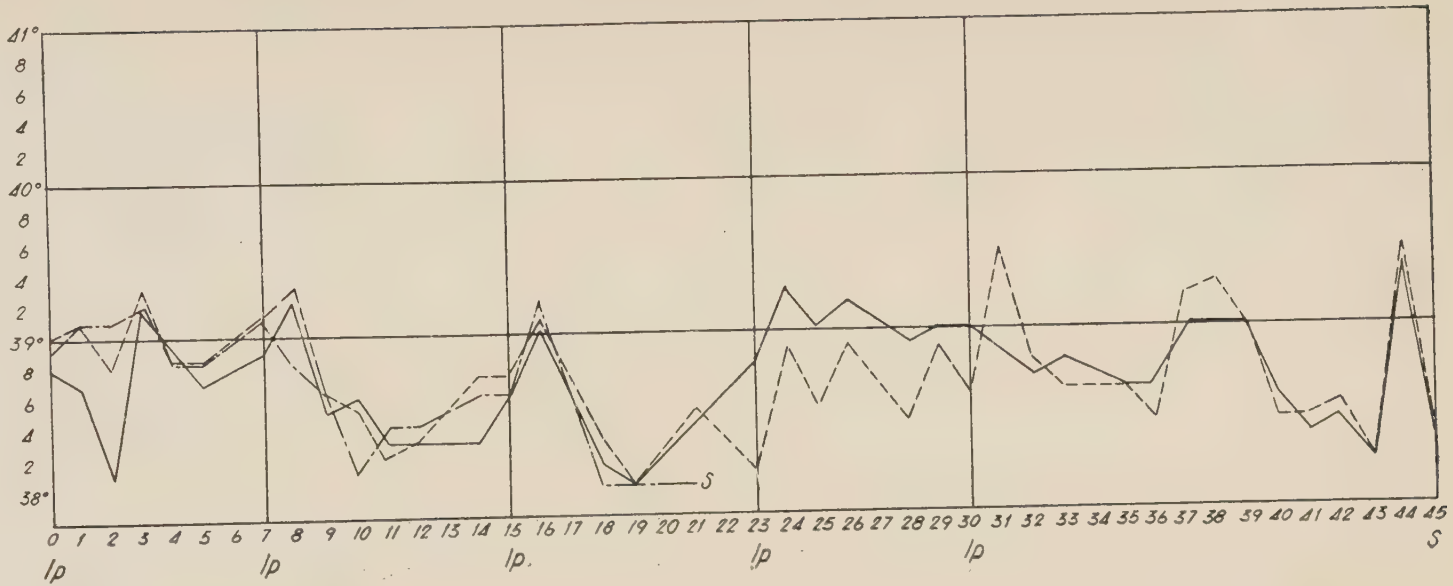
Temperaturas de los cobayos.
PAUTA 3.ª




Cobayo 2.°: ———— Suero 4.
" 3.°: .—.—.—. " 3.

Temperaturas de los cobayos.

PAUTA 4.ª




Cobayo 1.°: ---------- Suero 5.
" 2.°: ———— " 6.
" 3.°: .—.—.—.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 1.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.
Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | Intracerebral. Suspensión del virus | Cantidad | 1.ª Intraperit. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intraperit Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 532 | 1/10 | 0,15 c.c | 1/10 | 0,50 c.c. | 1/10 | 1 c. c. | Sangría a los 15 días. Suero num. 1. |
| 2.º | 440 | 1/10 | 0,15 | 1/10 | 0,50 | 1/10 | 1 " | Sangría a los 15 días. Suero n.º 2. |

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 2.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.
Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | Intrancerebral Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|
| 1.º | 700 | 1/10 | 0,20 c. c. | Sangría a los 15 días. Suero núm. 3. |
| 2.º | 770 | 1/10 | 0,20 " | Sangría a los 15 días. Suero núm. 4. |

Se vuelve a sangrar a los dos cobayos de esta última experiencia a los treinta y ocho días de la primera sangría, obteniéndose los sueros núm. 5 y núm. 6.

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.
Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | Intracerebral Suspensión del virus | Cantidad | 1.ª Intraperit. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intraperit. Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 610 | 1/10 | 0,15 c. c. | 1/10 | 1 c. c. | 1/10 | 2 c. c. | Sangría a los 15 días. Suero núm. 7. |
| 2.º | 570 | 1/10 | 0,15 | 0 | 0 | 0 | 0 " | Sangría a los 15 días. Suero núm. 8. |
| 3.º | 540 | 1/10 | 0,15 | 1/10 | 1 | 1/10 | 2 " | Sangría a los 15 días. Suero núm. 9. |

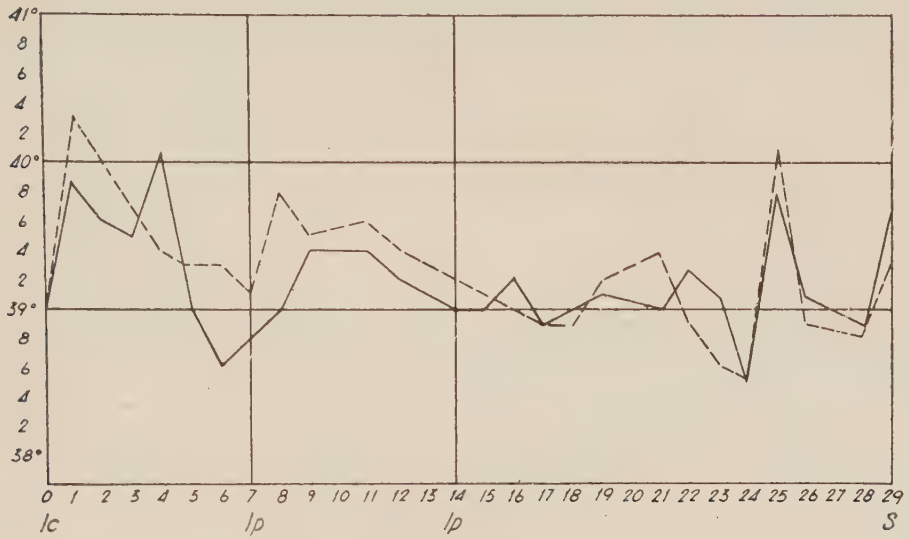


Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.
Animales inoculados: Cobayos machos.

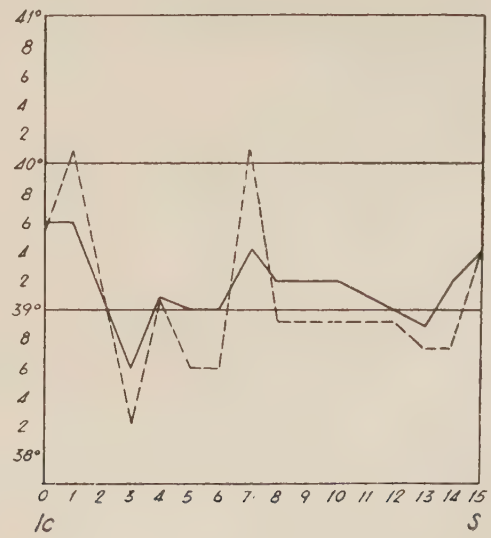
| Cobayo | Peso Grs. | Vía de inoculación intraperitoneal | Dilución | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 700 | 1.ª, 2.ª, 3.ª, 4.ª, 5.ª | 1/100 | 4 c. c. | Sangría a los 15 días. Suero núm. 10. |
| 2.º | 610 | 1.ª | 1/100 | 4 " | Muere a los 2 días. |
| 3.º | 550 | 1.ª, 2.ª, 3.ª, 4.ª, 5.ª | 1/100 | 4 " | Sangría a los 15 días. Suero núm. 11. |

Temperatura de los cobayos.

PAUTA 1.ª

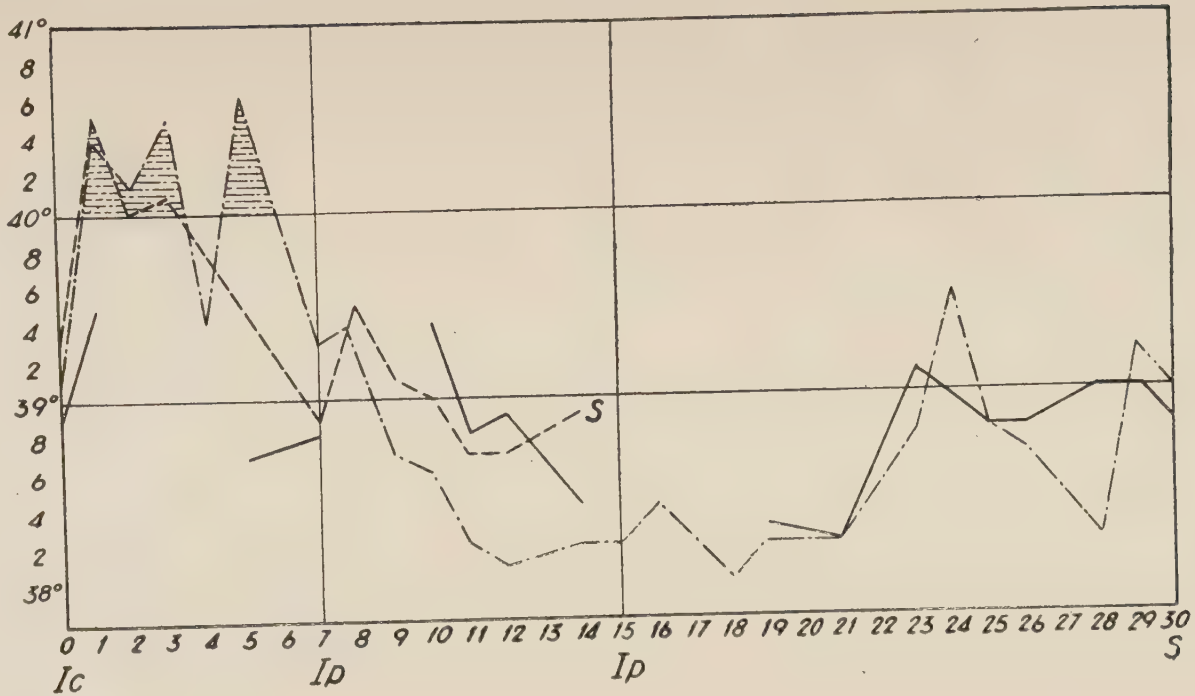



PAUTA 2.ª




Cobayo 1.º: ---------- Suero 1.
" 2.º: — ——— " 2.

Temperatura de los cobayos.
PAUTA 3.ª




Cobayo 1.º: ---------- Suero 7.
" 2.º: —+—————— " 8.
" 3.º: .—.—.— " 9.

Temperatura de los cobayos.

PAUTA 4.ª

Cobayo 1.º: ---------- Suero 10.
" 3.º: .—.—.— " 11.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 1.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de cobayo.

Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | 1.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 241 | 1/10.000 | 0,5 c. c. | 0 | 0 | Muere a los 7 días. |
| 2.º | 295 | » | » | » | » | Muere a los 7 días. |
| 3.º | 280 | » | » | » | » | Muere a los 7 días. |
| 4.º | 280 | » | » | 1/5.000 | 0,5 c. c. | Muere a los 5 días. |

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 2.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de cobayo.

Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | 1.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 1.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | Intrac. suspen. virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 281 | 1/20.000 | 0,5 c. c. | 1/10.000 | 0,5 c. c. | 1/10.000 | 1 c. c. | 0 | 0 | 0 | 0 | Muere a las 18 horas. |
| 2.º | 301 | » | » | » | » | 1/20.000 | » | 1/1.000 | 1 c. c. | 0 | 0 | Muere a los 3 días. |
| 3.º | 296 | » | » | » | » | » | » | » | » | 1/1.000 | 0,1 c. c. | Sangría a los nueve días. Suero n.º 1. |

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 2.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de cobayo.

Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | 1.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | 1.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | Intrac. suspen. virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 285 | 1/20.000 | 0,5 c. c. | 1/10.000 | 0,5 c. c. | 1/20.000 | 1 c. c. | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/1.000 | 0,1 c. c. | Muere a las 18 horas. |
| 2.º | 312 | " | " | " | " | 1/10.000 | " | 0 | 0 | 0 | 0 | Muere a los tres días. |
| 3.º | 290 | " | " | " | " | " | " | " | " | " | " | Muere a los 6 días. |

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 3.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de cobayo.

Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | 1.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 1.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | Intrac. Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 315 | 1/10.000 | 0,5 c. c. | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/20.000 | 1 c. c. | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/10.000 | 0,15 c. c. | Muere a los 2 días. |
| 2.º | 295 | " | " | " | " | " | " | " | " | " | " | Muere a las 18 horas. |
| 3.º | 385 | " | " | " | " | 1/40.000 | " | " | " | " | " | Muere a los 4 días. |
| 4.º | 410 | " | " | " | " | " | " | " | " | " | " | Sangría a los 7 días. Suero n.º 2. |

Animal inoculado: Cobayo 4.º de experiencia anterior.

| 3.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | 4.ª Intraper. Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|
| 1/5.00 | 1 c. c. | 1/2.500 | 1 c. c. | Sangría a los 13 días. Suero número 3. |

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 4.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de cobayo.

Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | 1.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 1.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | Intrac. Suspensión del virus. | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 550 | 1/10.000 | 0,5 c.c. | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/20.000 | 1 c. c. | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/10.000 | 0,1 c. c. | Sangría a los 17 días. Suero n.º 4. |
| 2.º | 525 | " | " | " | " | " | " | " | " | " | " | Sangría a los 17 días. Suero n.º 5. |

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 5.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de cobayo.

Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | 1.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 1.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | Intrac. Suspensión del virus. | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 485 | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/20.000 | 1 c. c. | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/10.000 | 0,1 c. c. | Muere a las 18 horas. |
| 2.º | 510 | " | " | " | " | " | " | " | " | " | " | Sangría a los 15 días. Suero n.º 6. |
| 3.º | 560 | " | " | " | " | " | " | " | " | " | " | Sangría a los 15 días. Suero n.º 7. |

Animales inoculados: Cobayas 2.º 3.º de la experiencia anterior.

| Cobayo | 3.ª Intraper. Suspensión del virus. | Cantidad | 4.ª Intraperitoneal. Suspensión del virus. | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|
| 2.º | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/5.000 | 1 c. c. | Muere a las 18 horas. |
| 3.º | " | " | " | " | Sangría a los 15 días. Suero núm. 9. |

(El suero núm. 8 procede de una segunda sangría a los ciento once días de la primera, del cobaya núm. 4 de la pauta 3.ª y del cual se obtuvo el suero núm. 2.)

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUEROS HIPERINMUNES — PAUTA 6.ª

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de cobayo.

Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | 1.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Subcut. Suspensión del virus | Cantidad | 1.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intrap. Suspensión del virus | Cantidad | Intrac. suspensión del virus. | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 490 | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/5.000 | 1 c. c. | 1/10.000 | 1 c. c. | 1/5.000 | 1 c. c. | 1/10.000 | 0.15 c. c. | Muere a las 18 horas. |
| 2.º | 535 | " | " | " | " | " | " | " | " | " | " | Sangría a los 15 días. Suero n.º 10. |

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de cobayo.
Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | 1.ª Subcut. Suspensión de virus | Cantidad | 2.ª Subcut. Suspens. de virus. | Cantidad | Intraper. Suspensión de virus | Cantidad | Intracer. Suspens. de virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 216 | 1/10.000 | 0,50 c. c. | 1/1.000 | 0,50 c. c. | 1/1.000 | 1 c. c. | 1/1.000 | 0,10 c. c. | Muere a las 18 horas. |
| 2.º | 269 | " | " | " | " | " | " | " | " | Sangría a los 15 días. Suero n.º 1. |
| 3.º | 320 | " | " | " | " | " | " | " | " | Sangría a los 15 días. Suero n.º 2. |



Se parte de suspensión virulenta de cerebro de cobayo.
Animales inoculados: Cobayos machos.

| Cobayo | Peso Grs. | 1.ª Subcut. Suspensión de virus | Cantidad | 2.ª Subcut. Suspens. de virus. | Cantidad | Intraper. Suspensión de virus | Cantidad | Intracer. Suspens. de virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.º | 330 | 1/10.000 | 0.50 c. c. | 1/1.000 | 0,50 c. c. | 1/1.000 | 1 c. c. | 1/1.000 | 0,10 c. c. | Muere a las 24 horas. |
| 2.º | 350 | " | " | " | " | " | " | " | " | Sangría a los 15 días. Suero n.º 3. |
| 3.º | 390 | " | " | " | " | " | " | " | " | Suero n.º 4. |

Se parte del mismo material de la experiencia anterior.
Animales inoculados: Los mismos de la experiencia anterior.

| Cobayo | 1.ª Intraper. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intraper. Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|
| 2.º | 1/500 | 1 c. c | 1/250 | 1 c. c. | Sangría a los 11 días. Suero n.º 5. |
| 3.º | " | " | " | " | Sangría a los 11 días. Suero n.º 6. |



Se parte del mismo material de la experiencia anterior.
Animales inoculados: Los mismos de la experiencia anterior.

| Cobayo | 1.ª Intraper. Suspensión del virus | Cantidad | 2.ª Intraper. Suspensión del virus | Cantidad | Resultados |
|---|---|---|---|---|---|
| 2.º | 1/100 | 1 c. c. | 1/50 | 1 c. c. | Sangría a los 13 días. Suero n.º 7. |
| 3.º | " | " | " | " | Sangría a los 13 días. Suero n.º 8. |

*C. S. I. C.*
*INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL*
*SECCION DE MICROBIOLOGIA, DE MADRID*

# ESTUDIOS SOBRE NODULO-BACTERIAS. I

por
Gregorio Fraile Ramos

## INTRODUCCION

Sería conveniente hacer una sucinta exposición del estado actual de los trabajos sobre nódulo-bacterias. Pero no se va a repetir aquí la historia y evolución de los estudios sobre estos microrganismos, pues hay excelentes monografías, verdaderos tratados sobre ellos, en los cuales se tocan todos los aspectos de sus caracteres bacteriológicos, bioquímicos y fisiológicos, e incluso el aspecto utilitario de la inoculación de semillas. Se trata de la obra de Fred, E. B., Baldwin, I. L., and McCoy, Elisabeth «Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants», modelo de exposición, y gracias a la cual se ha conseguido documentación, sobre todo lo que se refiere a dicho problema, por la obra misma y por la extensa bibliografía que contiene (cerca de 1.000 referencias); pero dicha obra, en su perfección, queda limitada a la fecha de su publicación (1932), comenzando aquí una etapa que abarca los últimos veinte años, en que es necesario el examen de muchos trabajos aparecidos periódicamente en diversas publicaciones científicas, pero que reclaman una constancia y tiempo material que bien se podía haber ahorrado de existir otra monografía que, con la autoridad de la citada, diera una nueva visión del estado actual de tan apasionante problema.

Bien es verdad que desde el punto de vista bioquímico existe la obra de Wilson, de 1940, «The Biochemistry of Symbiotic Fixation», pero en los restantes aspectos, los trabajos aparecen diseminados en diversas publicaciones y revistas científicas; más recientemente ha sido útil, desde el

punto de vista de los cultivos de invernadero, el Manual de O. N. Allen «Experiments in Soil Bacteriology» en los capítulos relativos a los rizobios.

Bergey's, en su «Manual of Determinative Bacteriology», sexta edición, 1948, dentro de la familia Rizobiáceas, se incluye el género Rhizobium, describiendo las seis especies, representativas de los seis grupos de inoculación cruzada con las siguientes denominaciones:

Rhizobium trifolii (Dangear).
Rhizobium Phaseoli (Dangear).
Rhizobium leguminosarum (Frank).
Rhizobium meliloti (Dangear).
Rhizobium lupini (Schroeter).
Rhizobium japonicum (Kirchner).

Se hace constar, por lo que se refiere al presente trabajo, que muchas de las estirpes aisladas difieren algo de los prototipos descritos por Bergey's, en el cual sólo ha servido de criterio para la existencia del género Rhizobium incluir en él a las bacterias capaces de invadir las raíces de las leguminosas y estimular la producción de nódulos; pero lo interesante del problema es el aspecto simbiótico con la planta huésped; es decir, la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, a la cual se debe la extraordinaria importancia de estas bacterias en Agricultura, esto es, que sean efectivas, además de la propiedad de infectar, como son todas las que producen nódulos.

Sobre este aspecto, las investigaciones han sido copiosas y trascendentales; menos afortunadas las relativas a la vida independiente de los rizobios en el suelo, y mucho menos aún, las pruebas para tratar de demostrar la capacidad de fijar nitrógeno fuera de la planta huésped, bien en el suelo o en cultivos puros.

Pasada la larga etapa dedicada a la revisión de tan extensa bibliografía, pareció conveniente como preliminar de la investigación poner en práctica los métodos considerados como mejores para el aislamiento de las bacterias de los nódulos de las raíces de leguminosas, empleando buena parte de los medios considerados como selectivos, en cuya tarea se vislumbró que ciertas modificaciones podrían ser convenientes para obtener mayor constancia en el aislamiento y eliminar la interferencia, no de gérmenes considerados claramente de contaminación y que crecen tardíamente en estos medios, sino aquellos otros que aparecen con frecuencia en

las placas de aislamiento y que, siendo muy semejantes a los verdaderos rizobios, carecen de las propiedades inherentes al género, es decir, de la capacidad para infectar las raíces de leguminosas (virulencia o facilidad para penetrar en los pelos radicales de la planta huésped).

No es suficiente que las colonias que aparecen en las placas del aislamiento inicial procedan de un nódulo que se ha separado de una raíz de leguminosa para poderlas considerar como de rizobios, pues otras especies de la misma familia Rizobiáceas, pertenecientes al género Agrobacterium, pueden dar colonias en los medios empleados para los rizobios, de aspecto semejante a las de éstos, y como además la forma y comportamiento colorante son similares, pueden inducir a error y contribuir a desacreditar entre los agricultores el método de inoculación de semillas con vistas a incrementar sus cosechas. Concretando más, dentro de este género el Bergey's describe las siguientes especies: Agrobacterium rubi; Agr. rizogenes; Agr. tumefaciens; Agr. radiobacter. El autor de este trabajo considera raras las dos primeras, más frecuente la tercera y mucho más frecuente la última, o Agrobacterium radiobacter.

En este trabajo se pretende contribuir a disipar la incertidumbre y dificultades que han acompañado durante varios años a la identificación de las especies del género Rhizobium.

Por suponer que aún no ha sido publicada, se transcribe a continuación la comunicación presentada por el autor al Congreso Luso-Español de Farmacia, celebrado en Oporto en mayo de 1952.

«La experiencia adquirida en el transcurso de muchos aislamientos de Rhizobium, practicados en la Sección de Microbiología del Instituto de Edafología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, nos ha llevado a establecer algunas modificaciones en la técnica, que nos parecen las más apropiadas y convenientes.

1.ª Para el aislamiento de las bacterias deben elegirse los nódulos de la parte superior de la raíz, los más sonrosados y arracimados, pues hemos podido comprobar que, debido a su mayor número de bacterias, el crecimiento de las siembras que se efectúan a partir de ellos es más exuberante.

2.ª El lavado clásico en cloruro mercúrico, que algunos autores (Pochon) hacen durar hasta treinta minutos, lo hemos encontrado excesivo aun para nódulos grandes, llegando a ejercer acción nociva sobre las bacterias del interior del nódulo en la mayor parte de los casos. La desinfección de la superficie debe comenzar por un fuerte lavado de

la raíz o trozo de ésta de donde se elija el nódulo, separando después éste y sumergiéndole en agua estéril en una placa Pétri; el nódulo separado se trata con solución de cloruro mercúrico al 1 por 1.000 durante uno a cinco minutos, según su tamaño, y con un tiempo medio de tres minutos.

3.ª Tanto en los nódulos grandes como en los más pequeños seguimos siempre la técnica de seccionarlos longitudinalmente sobre una placa o porta estériles, con un bisturí muy fino esterilizado; con un hilo de platino que tiene doblado su extremo en forma roma (no de asa ni de aguja) tomamos del interior del nódulo y se siembra por estría sin recargar el hilo, en tres placas de Petri que contienen el medio apropiado. El mejor es una modificación del llamado 79, con varias sales, manitol y extracto de levadura, en el que se ha reducido la cantidad de carbonato cálcico para evitar que precipite algo durante la esterilización; si el agua de levadura se prepara con extracto Difco, se obtiene un medio de composición definida, que se comporta siempre con regularidad. En este medio, a los cuatro, cinco o más días de estar a la temperatura del laboratorio o en estufa a 25º, se obtienen colonias de aspecto típico, aunque variable, según el grupo del Rhizobium, debiendo hacer constar que ha habido casos en los que suprimiendo la desinfección por el cloruro mercúrico, sometiendo el nódulo a la acción del acohol de 70º durante cinco minutos, y aun prescindiendo de desinfectar, por el solo efecto de cuidadosos lavados y de la técnica de seccionarlos como hemos dicho, no se han obtenido contaminaciones apreciables y cuando las hay son mucho menos numerosas que empleando la técnica de aplastamiento del nódulo entre dos portas.

4.ª Si bien el aspecto de las colonias obtenidas nos muestra la ausencia de contaminaciones, no es suficiente para asegurarnos de que éstas sean de genuinos Rhizobium, pues podían confundirse con las de Agr. radiobacter y obtener fracasos en la inoculación de semillas, por carecer estos útimos de la propiedad de formar nódulos y de fijar el nitrógeno atmosférico.

Surge, por tanto, el problema de asegurarnos de que las colonias obtenidas son de verdaderos Rhizobium, para lo cual nos valdremos de diversos caracteres culturales y reacciones bioquímicas de las dos especies en los diferentes medios de cultivo. Se marca una colonia, típica y bien aislada (para no correr el riesgo de que pueda confluir con otras de la placa, al seguir el crecimiento en el medio inicial 79M), y se resiembra en placas con medio que contiene cristal violeta en una concentración del 1/100.000, modificación del propuesto con Leonard, del cual difiere, porque el de dicho investigador va a base de extracto de tierra, nitrato sódico y glicerina, y el que nosotros proponemos es el mismo medio 79M, adicionado tan sólo del coloran-

te mencionado, pues nos ha parecido oportuno no variar el manitol como fuente de energía, eliminar el nitrato sódico y suprimir una cosa tan compleja como es el extracto de tierra, o sea que, guardando las condiciones del medio empleado en el primer aislamiento sólo difiere en la presencia del cristal violeta; en tal medio, las colonias de Rhizobium son pequeñas, con poca o ninguna absorción de colorante; las de Agr. radiobacter son mayores y muy coloreadas en el centro, aunque con los bordes más claros.

Si en tal medio con colorante las colonias son del tipo reseñado como de rizobio, se seguirá la identificación de éste, confeccionando una sencilla carta bacteriológica, bien entendido que será a partir de la colonia marcada en la placa del medio 79M con la que se resembró la placa con colorante.

Las principales características de cultivo que trataremos de comprobar son las siguientes:

a) La ya citada de dar colonias pequeñas no pigmentadas o con ligera absorción cuando crecen en medio 79M con cristal violeta.

b) Sembrando en estría sobre agar inclinado en medio 79M dan crecimiento abundante con tendencia a extenderse, semitranslúcido, mucilaginoso, caracteres que difieren ligeramente según el grupo o especie de rizobio (se deben resembrar varios tubos inclinados para que en el caso de que responda a todas las características conservarlos, resembrando cada mes).

c) Acción sobre la leche tornasolada, consistencia, acidez o alcalinidad, según la especie, formación de suero o no, dependiente del grupo a que pertenece.

d) Comprobar en el medio líquido nitratado de Sagen que los nitratos no desaparecen del medio, aunque pueden ser reducidos; los nitritos no son utilizados.

e) En caldo triptofano, la no producción de indol; en el medio de Clark y Lubs, la reacción con el reactivo de V. P. será negativa, igualmente la del R. M.

Por el contrario, si las colonias del medio con cristal violeta son presuntas de Agr. radiobacter, grandes, con el centro muy coloreado y los bordes más claros, se comprobará la reducción fuerte de los nitratos, desapareciendo éstos del medio; el obscurecimiento del medio manitol-glicerofosfato-agar, y el crecimiento en caldo 79M, aun a pH alto, 10-11, o mejor, de pH 12.

## PARTE EXPERIMENTAL

1.º Trabajos preliminares: Comprenden todos los precisos para llegar a un estudio bacteriológico detenido de los rizobios, con las modifica-

ciones para su perfecta identificación y diferenciación, ya expuestas anteriormente.

2.º Aplicar dicha experiencia al aislamiento del mayor número de estirpes, confeccionando con cada una de éstas una carta bacteriológica conteniendo los caracteres culturales y bioquímicos principales para tratar de establecer en sucesivos trabajos la relación que pueda existir entre algunos de estos caracteres y sus propiedades fisiológicas, en cuanto a la producción de nódulos y fijación del nitrógeno atmosférico; y

3.º Tomar algunas de estas estirpes y experimentar en cultivos de invernadero su manera de comportarse en las distintas circunstancias utilizadas, siendo este punto la verdadera parte experimental de este trabajo.

Se comienza por hacer una exposición de las estirpes aisladas, y para no alargarla demasiado será condensada en los cuadros números 1 al 8, inclusive.

Se hace notar que el número de estirpes aisladas ha sido mayor que el incluído en estos cuadros, y los números con que se designan son convencionales, aunque la cifra en que terminan es constante para cada grupo: así las del Rh. trifolii terminan en 1; en 2 las de Phaseoli; en 3 las del grupo Rh. leguminosarum; en 4 las de Rh. meliloti; en 5 las del grupo Rh. lupinus, y en 6 las de la soja.

CUADRO N.º 1

RHIZOBIUM TRIFOLII

| Estirpes | 1.111 | 1.121 | 1.131 | 1.141 | 1.151 | 1.161 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Origen o procedencia | Trifolium rep. (Jard. C. S. I. C.) | Tr. pratense (Jard. Botánico) | Tr. alexandrin. (Jard. I. N. V. S.) | Tr. repens (Jar. C. S. I. C.) | Tr. incarnatum (Pontevedra) | Tr. repens (Jard. C. S. I. C.) |
| Nódulos... ... ... ... | Abundantes | Escasos | Regulares | Abundantes | Regulares | Escasos |
| Nódulo elegido... ... | Superior | Superior | Medio | Inferior | Superior | Medio |
| Bacteroides ... ... ... | En maza | Vacuolados y m. | Maza | Vacuolados | Vacuol. y maza | Maza |
| F.ª aislamiento... ... | Jul. 1951 | Oct. 1951 | Oct. 1951 | Feb. 1952 | May. 1952 | Mayo 1952 |
| Medio empleado. ... | 79M. pH 7 | 79M. pH 7.5 | 79M. pH 7 | 79M. pH 6.5 | 79M. pH 6 | 79M. pH 8 |
| Crecimiento.... ... ... | Rápido 5 días | Rápido 5 d. | Moderado 8 d. | Lento 10 d. | Rápido 5 d. | Moderado 7 d. |
| Estría o colonia ... | Blanc. Mucosa | Bl.-am. Mucosa | Blanc. Mucosa | Bl. poco muc. | Blanc. Mucosa | Bl. Mucosa |
| Morfología ... ... ... | Bacilos med. | Cocos y bacil. | Bacilos gr. | Cocos y bac. | Bacilos med. | Bac. medianos |
| Coloración Gram ... | Negativos | Negativos | Negativos | Negativos | Negativos | Negativos |
| Cristal violeta ... ... | Col. peq. claras | Col. peq. claras | Col. peq. claras | Col. peq. claras | Col. peq. clar. | Col. peq. claras |
| Medio rojo congo ... | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe |
| Medio glicerofosfato . | No pardea | No pardea | No pardea | No pardea | No pardea | Lig. pardo |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Caldo 79. pH 12 ... | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece | |
| Leche tornasolada ... | Alc. y suero | Alc. y suero | Alc. y suero | Alc. y suero | Alc. y suero | Alc. y suero |
| Glucosa (1)... ... ... | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | + |
| Sacarosa... ... ... ... | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Xilosa ... ... ... ... | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| V. P. y R. M. ... ... | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas |
| Indol ... ... ... ... ... | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa |
| RESIEMBRAS | Jul. 1951 | Oct. 1951 | Oct. 1951 | Feb. 1952 | May. 1952 | May. 1952 |
| | Oct. 1951 | Dic. 1951 | Dic. 1951 | Abr. 1952 | Jun. 1952 | Jun. 1952 |
| | Dic. 1951 | Feb. 1952 | Feb. 1952 | Jun. 1952 | Jul. 1952 | Jul. 1952 |
| | Feb. 1952 | Abr. 1952 | Abr. 1952 | Jul. 1952 | Ago. 1952 | Ago. 1952 |
| | Abr. 1952 | Jun. 1952 | Jun. 1952 | Ago. 1952 | Sep. 1952 | Sep. 1952 |
| | Jun. 1952 | Jul. 1952 | Jul. 1952 | Sep. 1952. | Nov. 1952 | Nov. 1952 |
| | Jul. 1952 | Ago. 1952 | Ago. 1952 | Nov. 1952 | Ene. 1953 | Ene. 1953 |
| | Ago. 1952 | Sep. 1952 | Sep. 1952 | Ene. 1953 | | |
| | Sep. 1952 | Nov. 1952 | Nov. 1952 | | | |
| | Nov. 1952 | Ene. 1953 | Ene. 1953 | | | |
| | Ene. 1953 | | | | | |

(1) + Ac.; — Alc.; 0 Nada.

CUADRO N.º 2

RHIZOBIUM PHASEOLI

| Estirpes | 1.112 | 1.122 | 1.132 | 2.842 | 2.852 | 2.862 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Origen o procedencia | Phaseolus vulg. (Inv. Inst. Edaf.) | Ph. vulgaris (Huerta Baraj.) | Ph. angustifol. (Huerta Pardo) | Ph. vulgaris (Ins. Edaf.) | Ph. angustifol. (Inv. Ins. Ed.) | Ph. angustifol. (Inv. Ins. Ed.) |
| Nódulos ... ... ... | Escasos | Abundantes | Abundantes | Escasos | Abundantes | Abundantes |
| Nódulo elegido. | Medio | Superior | Inferior | Superior | Superior | Superior |
| Bacteroides ... ... | Vacuolados peq. | Vacuolados gr. | Vacuolados gr. | Vacuolad. peq. | Vacuolad. peq. | Vacuolad. peq. |
| F.ª aislamiento ... | Oct. 1951 | Oct. 1951 | Oct. 1951 | May. 1952 | May. 1952 | Ago. 1952 |
| Medio empleado. | 79 M. pH 7. | 79M. pH 6,5 | 79M. pH. 7,5 | 79M. pH. 7 | 79M. pH 6 | 79M. pH 8 |
| Crecimiento .. ... | Moderado 7 d. | Lento 9 d. | Moderado 7 d. | Moderado 8 d. | Lento 10 d. | Moderado 8 d. |
| Estría o colonia. | Bl-am. transluc. | Bl. transluc. | Bl. transluc. | Bl. transluc. | Bl. am. transl. | Bl. am. opaca |
| Morfología ... ... | Bacilos grand. | Bacilos med. | Bacil. grand. | Bac. medianos | Bacilos peq. | Bacilos peq. |
| Coloración Gram. | Negativos | Negativos | Variable | Negativos | Negativos | Negativos |
| Cristal violeta ... | Col. peq. claras | Col. peq. claras | Col. p. claras | Col. peq. clar. | Col. peq. claras | Col. peq. claras |
| Medio rojo congo. | No absorbe | No absorbe | No obsorbe | No absorbe | Lig absorción | No absorbe |
| Medio glicerofos. | No pardea | No pardea | No pardea | No pardea | Lig. pardo | No pardea |

| Medio nitratado. | Nitritos + | Nitritos ++ | Nitritos O. | Nitritos ++ | Nitritos +++ | Nitritos + |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Caldo 79. pH 12. | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece |
| Leche tornasol ... | Alcalina-suero | Alc. poco suero | Alc. y suero | Alc. mucho suero | Alc. poco suero | Alc. sin suero |
| Glucosa ... ... ... | +++ | +++ | +++ | + | +++ | ++ |
| Sacarosa ... ... ... | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| Xilosa ... ... ... | + | 0 | 0 | + | + | + |
| V. P. y R. M. ... | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas |
| Indol ... ... ... ... | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa |
| RESIEMBRAS | Oct. 1951 | Oct. 1951 | Oct. 1951 | May. 1952 | May. 1952 | Ago. 1952 |
| | Dic. 1951 | Dic. 1951 | Dic. 1951 | Jun. 1952 | Jun. 1952 | Sep. 1952 |
| | Feb. 1952 | Feb. 1952 | Feb. 1952 | Jul. 1952 | Jul. 1952 | Oct. 1952 |
| | Abr. 1952 | Abr. 1952 | Abr. 1952 | Ago. 1952 | Ago. 1952 | Nov. 1952 |
| | Jun. 1952 | Jun. 1952 | Jun. 1952 | Sep. 1952 | Sep. 1952 | Ene. 1953 |
| | Jul. 1952 | Jul. 1952 | Jul. 1952 | Oct. 1952 | Oct. 1952 | |
| | Ago. 1952 | Ago. 1952 | Ago. 1952 | Nov. 1952 | Nov. 1952 | |
| | Sep. 1952 | Sep. 1952 | Sep. 1952 | Ene. 1953 | Ene. 1953 | |
| | Oct. 1952 | Oct. 1952 | Oct. 1952 | | | |
| | Nov. 1952 | Nov. 1952 | Nov. 1952 | | | |
| | Ene. 1953 | Ene. 1953 | Ene. 1953 | | | |

CUADRO N.º 3

RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM

| Estirpes | 1.113 | 1.213 | 1.313 | 2.843 | 2.853 | 2.863 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Origen o procedencia | Vicia Faba (Huerta Pardo) | Vicia faba (Segovia) | Vicia faba (Toledo) | Vicia faba (Aranjuez) | Vicia faba (Valladolid) | Vicia faba (Huerta Pardo) |
| Nódulos ... ... ... ... | Escasos | Abundantes | Escasos | Abundantes | Abundantes | Escasos |
| Nódulo elegido ... ... | Superior | Superior | Superior | Inferior | Medio | Inferior |
| Bacteroides ... ... ... | Vacuolados | Vacuol. y maza | Vacuol. y maza | Maza | Vacuolados | Vacuolados |
| F.ª aislamiento ... ... | Nov. 1951 | Mar. 1952 | Mar. 1952 | May. 1952 | May. 1952 | May. 1952 |
| Medio empleado ... | 79M. pH 5,5 | 79M. pH 6 | 79M. pH 6,5 | 79M. pH 7. | 79M. pH 7,5 | 79M. pH. 8 |
| Crecimiento ... ... ... | Lento, doce días | Lento, doce días | Moderado 9 d. | Moderado. 8 d. | Rápido, 7 d. | Rápido, 7 d. |
| Estría o colonias ... | Blanco-viscoso | Bl.-am. viscoso | Bl.-am. viscoso | Blanco-viscoso | Blanco-viscoso | Blanco-viscoso |
| Morfología ... ... ... | Bastones móvil. | B. grandes | B. medianos | B. móviles | Bastones. gr. | B. peq. móvil. |
| Coloración Gram ... | Negativos | Variable | Variable | Negativos | Variable | Variable |
| Cristal violeta ... ... | Col. p. unif. t. | Col. p. unif. teñ. | Col. centro teñ. | Col. p, unif. teñ. | Col. p. unif. teñ. | Col. p. unif. teñ. |
| Medio rojo congo ... | No absorbe | Ligera absor. | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Medio glicerofosf. ... | No pardea | Lig. color pard. | Lig col. pardo | No pardea | No pardea | No pardea |
| Medio nitratado ... | Nitritos +++ | Nitritos +++ | Nitritos ++ | Nitritos ++ | Nitritos + | Nitritos + |
| Caldo 79. pH 12 ... | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece |
| Leche tornasolada ... | Alcalina-suero | Alc. y suero | Alc. y suero | Alc. poco suero | Alc. y suero | Alc. y suero |
| Glucosa ... ... ... ... | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ |
| Sacarosa ... ... ... ... | + | + | + | + | + | + |
| Xilosa ... ... ... ... | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| V. P. y R. M. ... ... | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas |
| Indol ... ... ... ... ... | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa |
| BESIEMBRAS | Nov. 1951<br>Dic. 1951<br>Feb. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Mar. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Mar. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | May. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | May. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | May. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 |

CUADRO N.º 4

RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM (Continuación)

| Estirpes | 93 | 113 | 123 | 133 | 143 | 103 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Origen o procedencia | Pisum sativum (Murcia) | Vicia sativa (Toledo) | Vicia sativa (Toledo) | Lathirus Latif (Jardín Bot.) | Lath. sativus (Segovia) | Pisum sativum (Segovia) |
| Nódulos ... ... ... ... | Abundantes | Abundantes | Abundantes | Regulares | Escasos | Escasos |
| Nódulo elegido ... ... | Superior | Superior | Inferior | Superior | Superior | Superior |
| Bacteroides ... ... ... | Maza y vacuola. | Maza y vacuol. | Vacuolados y M. | Ramificados | Ramificados | Vacuolados |
| F.ª aislamiento ... ... | Feb. 1952 | Mar. 1952 | Mar. 1952 | May. 1952 | May. 1952 | Ag. 1952 |
| Medio empleado ... | 79M. pH 7 | 79 M. pH 7 | 79 M. pH 7 | 79 M. pH 7 | 79 M. pH 7 | 79 M. pH 7 |
| Crecimiento ... ... ... | Moderado, 7 d. | Rápido, 6 d. | Rápido, 6 d. | Moderado, 7 d. | Lento, 9 d. | Lento, 10 d. |
| Estría-colonias ... ... | Bl.-am. viscoso | Bl. am. viscoso | Bl.-gris. visc. | Bl. am. viscoso | Bl. am. viscoso | Blanco-viscoso |
| Morfología ... ... ... | Bacilos med. | Bacilos cortos | Bacilos cortos | Bac. grandes | Bac. grandes | Bac. grandes |
| Coloración Gram ... | Negativos | Negativos | Negativos | Negativos | Negativos | Negativos |
| Cristal violeta ... ... | Col. peq. claras | Col, peq. claras | Col. med. clara | Col. med. clara | Col. peq. claras | Col. peq. claras |
| Rojo congo ... ... ... | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Medio glicerol. ... | No pardea | No pardea | No pardea | No pardea | No pardea | ... Pardea |
| Medio nitratado ... | Nitritos + | Nitritos + | Nitritos + | Nitritos ++ | Nitritos + | Nitritos + |
| Caldo 79. pH 12 ... | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece |
| Leche tornasol ... ... | Alc. y suero | Alc. poco suero | Alc. poco suero | Alc. y suero | Alc. mucho suero | Alc. y suero |
| Glucosa ... ... ... ... | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Sacarosa ... ... ... ... | ++ | ++ | + | + | + | + |
| Xylosa ... ... ... ... | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| V. P. y R. M. ... ... | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas |
| Indol ... ... ... ... ... | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa |
| RESIEMBRAS | Feb. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Mar. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Mar. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | May. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | May. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 |

CUADRO N.º 5

RHIZOBIUM MELILOTI

| Estirpes | 1.114 | 1.124 | 144 | 164 | 244 | 264 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Origen o procedencia | Medicago sat. (Huerta Pardo) | Medicago sat. (Toledo) | Melilotus alba (Jardín Bot.) | Medicago sat. (Huerta Pardo) | Medicago sat. (Toledo) | Medicago sat. (Segovia) |
| Nódulos ... ... ... ... | Escasos | Escasos | Abundantes | Escasos | Escasos | Escasos |
| Nódulo elegido ... ... | Lateral | Medio | Superior | Medio | Medio | Medio |
| Bacteroides ... ... ... | Ramificados | Ramificados | En Y, X, etc. | Poco ramificado | Peq. no ramific. | Bac. cortos |
| F.ª aislamiento ... ... | Oct. 1951 | Oct. 1951 | Oct. 1951 | Mar. 1952 | May. 1952 | Ago. 1952 |
| Medio empleado ... | 79M. pH 7 | 79M. pH 7 | 79M. pH 7 | 79M. pH 7 | 79M. pH 7 | 79M. pH 7 |
| Crecimiento ... ... ... | Rápido, 6 d. | Rápido, 6 d. | Rápido, 4 d. | Rápido, 5 d. | Rápido, 5 d. | Rápido, 5 d. |
| Estría o colonias ... | Bl. mantecosa | Bl. mantecosa | Blanco opaco | Bl.-ama. mantec. | Blanco-mantec. | Bl. mantecoso |
| Morfología ... ... ... | Bacilos y coc. | Bacilos med. | Bacilos med. | Bacilos med. | Bacilos cortos | Bacilos cortos |
| Coloración Gram ... | Negativos | Negativos | Negativos | Negativos | Negativos | Negativos |
| Cristal violeta ... ... | Col. peq. cl. | Col. peq. cl. | Col. poco teñ. | Col. peq. cl. | Col. peq. cl. | Col. peq. cl. |
| Rojo Congo ... ... | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe |
| Medio glicerofos. ... | No pardea | No pardea | No pardea | No pardea | No pardea | No pardea |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Medio nitratado ... | Nitritos 0 | Nitritos + | Nitritos + | Nitritos ++ | Nitritos 0 | Nitritos + |
| Caldo 79 pH 10 ... | No crece | No crece | No crece | Crece + | Crece + | Crece + |
| Caldo 79 pH 12 .. | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece |
| Leche tornasol ... | Acida y suero | Acida y suero | Acida y suero | Acida y suero | Acida y suero | Acida -- suero |
| Glucosa ... ... ... ... | + + + | + + + | + + + + | + + + | + + + + | + + + |
| Sacarosa ... ... ... ... | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + |
| Xylosa ... ... ... ... | + + + | + + + | + + + + | + + + + | + + + + | + + + |
| V. P. y R. M. ... | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas |
| Indol ... ... ... ... | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa |
| RESIEMBRAS | Oct. 1951<br>Dic. 1951<br>Feb. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Oct. 1951<br>Dic. 1951<br>Feb. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Oct. 1951<br>Dic. 1951<br>Feb. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Mar. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Mar. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 |

## CUADRO N.º 6

RHIZOBIUM LUPINI

| Estirpes | 1.115 | 1.215 | 1.315 | 1.175 | 1.185 | 1.285 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Origen o procedencia | Lupinus august. (Toledo) | Lupinus luteus (Córdoba) | Lup. angustifol (Toledo) | Lupinos ? (Pontevedra) | Ornithopus s. (Pontevedra) | O. sativus (Toledo) |
| Nódulos ... ... ... ... | Escasos | Escasos | Abundantes | Abundantes | Escasos | Escasos |
| Nódulo elegido ... ... | Inferior | Inferior | Superior | Medio | Superior | Superior |
| Bacteroides ... ... ... | Bac. largos | Bac. largos | Bac. medianos | Bac. largos | Bac. largos | Bac. largos |
| F.ª aislamiento ... ... | Oct. 1951 | Oct. 1951 | Mar. 1952 | May. 1952 | May. 1952 | Ago. 1952 |
| Medio empleado ... | 79M. pH 7 | 79M. pH 7 | 79M. pH 7 | 79M. pH 7 | 79M. pH 7 | 79M. pH 7 |
| Crecimiento ... ... ... | Lento, 15 d. | Lento, 15 d. | Lento, 12 d. | Moderado, 10 d. | Moderado, 9 d. | Moderado, 10 d. |
| Estría o colonia ... | Blanco-sucio | Blanco-gris | Blanco opaco | Bl. translúcido | Blanco sucio | Blanco sucio |
| Morfología ... ... ... | Bacilos cortos | Bacilos cortos | Bacilos cortos | Bacilos med. | Bacilos med. | Bacilos med. |
| Coloración Gram ... | Variable | Variable | Negativos | Negativos | Variable | Negativos |
| Cristal violeta ... ... | Col. peq. poc. t. | Col. peq. p. teñ. | Col. peq. p. teñ. | Col. peq. p. teñ. | Col. med. cent. V. | C. med. centro V. |
| Medio rojo congo ... | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe |
| Medio glicerofos ... | No pardea | No pardea | No pardea | No pardea | No pardea | Ligero col. pard. |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Medio nitratado ... | Nitritos +++ | Nitritos +++ | Nitritos + | Nitritos ++ | Nitritos ++ | Nitritos ++ |
| Caldo 79 pH 12 ... | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece | No crece |
| Leche Tornasol ... | Alc. sin suero | Alc. sin suero | Alc. sin suero | Alc. sin suero | Alc. sin suero | Alc. sin suero |
| Glucosa ... ... ... ... | (— — —) | (— — —) | (+ —) | (— — —) | (— — —) | (—) |
| Sacarosa ... ... ... | (— —) | (— —) | (—) | (— —) | (—) | (—) |
| Xiloxa ... ... ... ... | (— — —) | (— —) | (— —) | (— — —) | (— —) | (— —) |
| V. P. y R. M. ... ... | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas | Negativas |
| Indol ... ... ... ... | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa |
| R E S I E M B R A S | Oct. 1951<br>Dic. 1951<br>Feb. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Oct. 1951<br>Dic. 1951<br>Feb. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Mar. 1952<br>Abr. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | May. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | May. 1952<br>Jun. 1952<br>Jul. 1952<br>Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 | Ago. 1952<br>Sep. 1952<br>Oct. 1952<br>Nov. 1952<br>Ene. 1953 |

## CUADRO N.º 7

RHIZOBIUM JAPONICUM

Las estirpes de esta especie han sido remitidas de Barcelona, por lo cual se ha limitado a resembrarlas en medio 79 M, y seguir la identificación bacteriológica como en las anteriores.

Venían reseñadas con las notaciones 202 y 206, las cuales se han cambiado por las 2.026 y 2.066, respectivamente, quedando así incorporada la terminación en 6, para las estirpes de esta especie.

| Estirpe | 2.026 | 2.066 |
|---|---|---|
| Medio empleado ... ... | 79M pH 7 | 79M pH 7 |
| Estría o colonias ... ... | Blanco-sucio | Blanco-sucio |
| Crecimiento ... ... ... ... | Moderado, 7 d. | Moderado, 7 d. |
| Morfología ... ... ... ... | Bacilos lar. | Bacilos med. |
| Coloración Gram ... ... | Variable | Variable |
| Cristal violeta ... ... ... | Col. gr. viol. | Col. gr. viol. |
| Rojo congo ... ... ... ... | No absorbe | No absorbe |
| Medio Glicerofosf. ... | No pardea | Pard. lig. |
| Medio nitratado ... ... | Nitritos + + | Nitritos + + + |
| Caldo 79 pH 12 ... ... | No crece | Lig. crec. |
| Leche tornasolada ... ... | Alc. sin suero | Alc. sin suero |
| Glucosa ... ... ... ... ... | (— — —) | (— — —) |
| Sacarosa ... ... ... ... ... | (— — —) | (— — —) |
| Xyloxa ... ... ... ... ... | (— — —) | (— — —) |
| Arabinosa ... ... ... ... | + + | + |
| V. P. y R. M. ... ... ... | Negativas | Negativas |
| Indol ... ... ... ... ... ... | Negativa | Negativa |

| RESIEMBRAS | |
|---|---|
| Junio | 1951 |
| Septiembre | 1951 |
| Octubre | 1951 |
| Diciembre | 1951 |
| Febrero | 1952 |
| Abril | 1952 |
| Junio | 1952 |
| Julio | 1952 |
| Agosto | 1952 |
| Octubre | 1952 |
| Enero | 1953 |

## CUADRO N.º 8

AGROBACTERIUM RADIOBACTER

| Estirpes | R. 1 | R. 2 | R. 3 | R. 4 | R. 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Origen y procedencia | Aislada simultáneamente al Rhizobium 1.151 de dos colonias casi iguales en medio 79 M., que fué sembrado por aplastamiento, con un nódulo de Tr. incarnatum. | Aislada en iguales condiciones que la R. 1, y a la vez que el Rhizobium 1.132, de un nódulo de Ph. angustifol. | De igual manera, pero a partir de Vicia faba y a la vez que el Rhizobium 2.863 | Aislada de una raíz de M. sativa, de nódulos pobres y escasos, sin poder aislar el Rhizobium específico. Todas las colonias eran iguales. | Como la R. 4, de nódulo de raíz de Lupinus, sin hallar Rhizobium. |
| Morfología ... ... ... | Bacilos med. | Bac. grandes | Bac. medianos | Bac. medianos | Bacilos medianos |
| Coloración Gram ... | Variable | Viariable | Negativos | Negativos | Negativos |
| Cristal violeta ... ... | Colonias grandes pigmentadas cen. | Col grandes muy pigment. centro | Col. medianas muy pig. centro | Col. peq. muy pigment. centro | Col. grandes muy pig. centro y bordes |
| Rojo congo ... ... ... | No absorbe | No absorbe | No absorbe | No absorbe | Ligera absorción |
| Medio glicerofosf ... | Pardo | Pardo | Marrón, halo b. | Marrón | Marrón halo blanco |
| Caldo 79 pH 10 ... | Crece | Crece | Crece | Crece | Crece |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Caldo 79 pH 12 ... | Crece | Crece | Crece | Crece | Crece |
| Caldo peptona ... ... | Crece y velo | Crece y velo | Crece y velo | Crece y anill. | Crece y velo |
| Medio nitratado de Sagen ... ... ... | Nitritos ++++<br>Nitratos 0 | Nitritos ++++<br>Nitratos 0 | Nitritos ++++<br>Nitratos 0 | Nitritos ++<br>Nitratos ++ | Nitritos ++<br>Nitratos + |
| Leche tornasolada. | Suero, velo y color marrón | Mucho suero, velo y col. pardo | Mucho suero y velo; col. marrón | Poco suero, velo; color marrón. | No forma suero ni velo; col. marrón. |
| Glucosa ... ... ... ... | +++ | +++ | ++++ | ++++ | ++ |
| Sacarosa ... ... .. | (———) | (——) | (——) | (—) | (—) |
| Xilosa .. ... ... ... | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ |
| V. P. y R. M. ... ... | (+ —) y (+ —) | Negativas | Negativas | (+ —) y (+ —) | Negativas |
| Indol ... ... ... ... ... | (+ —) | (+ —) | (+ —) | Negativa | Negativa |
| Resiembras: | May. 1952<br>Jul. 1952<br>Oct. 1952 | May. 1952<br>Jul. 1952<br>Octu. 1952 | May. 1952<br>Jul. 1952<br>Oct. 1952 | Mar. 1952<br>May. 1952<br>Oct. 1952 | Mar. 1952<br>Mayo 1952<br>Oct. 1952 |

La primera intención fué que el presente trabajo abarcara un estudio fisiológico de las seis especies representativas de los grupos admitidos en la sistemática de Bergey's y, a tal objeto, se confeccionó el protocolo adjunto, en el que figuran todas las combinaciones en un total de 42, que al ser triplicadas, con vistas a la estadística, suman un total de 126 macetas, objeto del experimento. (En los cuadros 9 (I y II) se detallan todas las variables que figuran en el experimento.)

No se hubiera desistido de ello si el ciclo evolutivo de las distintas especies sembradas hubiera sido semejante; pero las diferencias observadas en el crecimiento de las seis especies y el deseo de no alargar ni demorar este trabajo indujeron a limitarlo a las macetas correspondientes a Pisum sativum, que, en número de 21, contenían las combinaciones existentes en las restantes en las que se comprobó la presencia, o no, de los nódulos y se fotografiaron las diferencias en el desarrollo de las plantas, dejando para otro trabajo posterior la determinación del nitrógeno fijado en el material soporte donde han crecido y el conocimiento de su acción fijadora y, por tanto, beneficiosa o eficaz.

Además, se han aislado de las plantas noduladas que no eran de Pisum sus estirpes de Rhizobium para conocer los cambios producidos en sus pases por las plantas. No están incluídas en los cuadros por no haber sido estudiadas bacteriológica y bioquímicamente.

Por el contrario, las macetas elegidas de Pisum sin ninguna otra preferencia que su más corto ciclo de crecimiento serán estudiadas en todos sus aspectos, siguiendo después un nuevo estudio bacteriológico y bioquímico de los rizobios aislados de sus nódulos para comprobar la constancia o variación de las principales características de este tipo. Este estudio figura en los cuadros 11 (I, II y III).

Hechas ya todas las consideraciones generales, tanto de orden expositivo como las preliminares de la experimentación, pasemos ya a la parte experimental propiamente dicha, objeto de este trabajo.

Su fin es tratar de demostrar:

1.º Que no todos los microorganismos aislados de los nódulos de raíces de plantas leguminosas son verdaderos rizobios, aunque tengan caracteres morfológicos idénticos, y hasta algunos culturales.

2.º Que parte de los fracasos obtenidos en la inoculación de semi-

Disposicion de los cultivar de Invernadero.
TIPO MUESTRA
DUPLICADO
TRIPLICADO

CUADRO N.º 9 (I)

DESCRIPCIÓN DE LA DISPOSICIÓN TOTAL DE LOS CULTIVOS EN EL INVERNADERO

| Leguminosa | Macetas | *Detalle de las variables existentes* |
|---|---|---|
| T R I F O L I U M R E P E N S | 1 - 43 - 85 | Testigos. (Sin inocular.) |
| | 2 - 44 - 86 | Inoculadas con estirpe aislada de nódulo de raíz de *Trifolium*, pero sin identificación bacteriológica completa. (Resultó *Agrobacterium radiobacter.*) |
| | 3 - 45 - 87 | Inoculadas con estirpe aislada del mismo nódulo que la anterior, tampoco completamente identificada. (Resultó *Rhizobium;* estirpe 1.151.) |
| | 4 - 46 - 88 | Inoculadas con *Rhizobium* específico, estirpe 1.121, bien identificada bacteriológicamente, empleando una resiembra de bacterias de cinco meses de antigüedad. |
| | 5 - 47 - 89 | Inoculadas con la misma estirpe que las anteriores, pero recientemente resembrada. |
| | 6 - 48 - 90 | Inoculadas con *Rhizobium* específico, estirpe 1.141, bien identificada bacteriológicamente, empleando una resiembra de bacterias, de cinco meses de antigüedad. |
| | 7 - 49 - 91 | Inoculadas con la misma estirpe que las anteriores, pero recientemente resembrada. |
| P H A S E O L | 8 - 50 - 92 | Testigos. (Sin inocular.) |
| | 9 - 51 - 93 | Inoculadas con estirpe aislada de nódulo de raíz de *Phascolus*, pero sin identificación bacteriológica completa. (Resultó al efectuar ésta un *Agrobacterium radiobacter.*) |
| | 10 - 52 - 93 | Inoculadas con estirpe aislada del mismo nódulo que la anterior, tampoco completamente identificada. (Resultó ser *Rhizobium.*) |

| | | |
|---|---|---|
| U S | 11 - 53 - 95 | Inoculadas con Rhizobium específico, estripe 1.112, bien identificada bacteriológicamente, empleando una resiembra de bacterias procedente de febrero de 1952. |
| V U L G A R I S | 12 - 54 - 96 | Inoculadas con la misma estirpe que las anteriores, pero resiembra reciente. |
| | 13 - 55 - 97 | Inoculadas con *Rhizobium* específico, estirpe 1.132, bien identificada bacteriológicamente, empleando bacterias procedentes de una resiembra de febrero de 1952. |
| | 14 - 56 - 98 | Inoculadas con la misma estirpe que las anteriores, pero la suspensión de bacterias empleadas procede de una resiembra de junio de 1952. |
| | 15 - 57 - 99 | Testigos. (Sin inocular.) |
| P I S U M | 16 - 58 - 100 | Inoculadas con estirpe aislada de *Vicia faba*, pero sin identificación bacteriológica completa. (Resultó *Radiobacter.*) |
| | 17 - 59 - 101 | Inoculadas con estirpe aislada del mismo nódulo que la anterior, tampoco completamente identificada. (Resultó *Rhizobium.*) |
| S A T I V U M | 18 - 60 - 102 | Inoculadas con *Rhizobium* específico, estirpe 1.113, bien caracterizada bacteriológicamente. Empleada una resiembra de bacterias de febrero de 1952. |
| | 19 - 61 - 103 | Inoculadas con la misma estirpe que las anteriores, pero con resiembra reciente. |
| | 20 - 62 - 104 | Inoculadas con *Rhizobium específico*, estirpe 93, aislada de *Pisum*, y bien caracterizada bacteriológicamente, fué empleada una resiembra de febrero de 1952. |
| | 21 - 63 - 105 | Inoculadas con la misma estirpe que las anteriores, pero de resiembra reciente. |

CUADRO N.º 9 (II)

SIGUE LA DESCRIPCIÓN DE LA DISPOSICIÓN TOTAL DE LOS CULTIVOS EN EL INVERNADERO

| Leguminosa | Macetas | *Detalle de las variables existentes* |
|---|---|---|
| | 22 - 64 - 106 | Testigos. (Sin inocular.) |
| M E D I C A G O | 23 - 65 - 107 | Inoculada con estirpe aislada de nódulo de raíz de Medicago, pero empleada sin completa identificación bacteriológica. (Al efectuar ésta resultó *Agrobacterium radiobacter*.) |
| | 24 - 66 - 108 | Inoculadas con otra estirpe aislada del mismo nódulo que la anterior, empleada también sin identificación bacteriológica. (Resultó también *Radiobacter*.) |
| | 25 - 67 - 109 | Inoculadas con *Rhizobium* específico, estirpe 1.124, bien identificada bacteriológicamente. Se empleó una resiembra de bacterias de febrero de 1952 (cinco meses). |
| S A T I V A | 26 - 68 - 110 | Inoculadas con la misma estirpe que las anteriores. Resiembra reciente. |
| | 27 - 69 - 111 | Inoculadas con *Rhizobium* específico, estirpe 144, bien identificada bacteriológicamente. Se utilizaron bacterias procedentes de resiembra de febrero. |
| | 28 - 70 - 112 | Inoculadas con igual estirpe que las anteriores. Resiembra reciente. |
| | 29 - 71 - 113 | Testigos. (Sin inocular.) |
| L U P I | 30 - 72 - 114 | Inoculadas con estirpe aislada de nódulo de raíz de *Lupinus*, pero empleada sin identificación bacteriológica completa. (Resultó ser *Agrobacterium radiobacter*.) |

| | | |
|---|---|---|
| NUS | 31 - 73 - 115 | Inoculadas con otra estirpe aislada del mismo nódulo que la anterior y que al ser identificada bacteriológicamente también resultó *Agrobacterium radiobacter*. |
| ANGUSTIFOLIUS | 32 - 74 - 116 | Inoculadas con estirpe 1.115, bien identificada como *Khizobium*, y aislada de nódulo de raíz de *Lupinus*. Se empleó una resiembra de bacterias de cinco meses (febrero). |
| | 33 - 75 - 117 | Inoculadas con igual estirpe que las anteriores. Resiembra reciente. |
| | 34 - 76 - 118 | Inoculadas con *Rhizobium* específico, estirpe 1.215, bien identificada bacteriológicamente. Se empleó una resiembra de bacterias de febrero (cinco meses). |
| | 35 - 77 - 119 | Inoculadas con la misma estirpe que las anteriores, pero la suspensión de bacterias empleada procede de resiembra reciente. |
| SOJA | 36 - 78 - 120 | Testigos. (Sin inocular.) |
| | 37 - 79 - 121 | Inoculadas con estirpe 202 (2026). |
| | 38 - 80 - 122 | Inoculadas como las anteriores. |
| MAXIMA | 31 - 81 - 123 | Inoculadas con estirpe 206 (2.066). |
| | 40 - 82 - 124 | Inoculadas como las anteriores. |
| | 41 - 83 - 125 | Inoculadas con las dos estirpes 2.026 y 2.066. |
| | 42 - 84 - 126 | Inoculadas como las anteriores. |

llas se deben a la anterior confusión, nacida del poco interés concedido a la caracterización de los gérmenes inoculantes.

3.º La necesidad de confeccionar para cada estirpe aislada una ficha o breve carta bacteriológica, conteniendo las principales pruebas que la caracterizan como tal para relacionar éstas con la propiedad de formar nódulos y con su efectividad para fijar el nitrógeno atmosférico.

4.º La influencia de la antigüedad de las resiembras sobre la citada infectividad y fijación;

y 5.º Las diferencias en estas propiedades cuando la estirpe inoculante lo hace sobre una semilla de leguminosa de su grupo, aunque no de su misma especie y lo que ocurre cuando grupo y especie coinciden.

Para el experimento se han elegido las siguientes estirpes:

3. Aislada de una raíz de Vicia faba procedente de la huerta de la carretera de El Pardo (junto al Instituto Llorente) sin más caracteres que el ser resembrada de una colonia de aspecto de Rhizobium, existente en una de las placas del medio 79M donde, por aplastamiento, se sembró el nódulo para aislamiento inicial. (Dicha estirpe posteriormente, por su avirulencia para producir nódulos, fué identificada como Agrobacterium radiobacter, que sigue figurando en la tabla de éstos como la estirpe A. 3.

13. También aislada de la misma raíz que la anterior y resembrada de una colonia casi idéntica, que existía en otra placa del citado medio 79M, y que resultó después de comprobada su capacidad para nodular un típico Rhizobium, pasando, después de ser ampliamente caracterizada, a denominarse estirpe 2863, que figura en el cuadro corespondiente a Rh. leguminosarum.

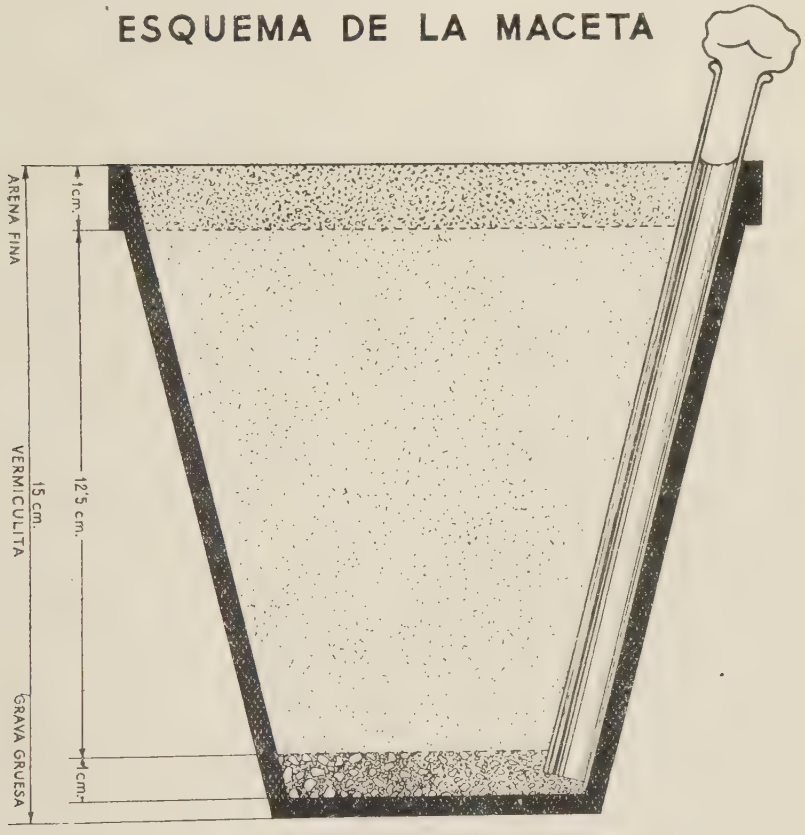
Queda bien sentado que dos microrganismos de distinto género, aunque relacionados, pueden existir en el mismo nódulo o cerca de él, y serán aislados conjuntamente si, como en este caso (intencionadamente), el nódulo se aplastó en vez de seccionarle, como hemos propugnado.

Estirpe 1113. Igualmente aislada con anterioridad a las citadas, de un nódulo de Vicia faba, en la misma huerta de El Pardo, con caracteres bioquímicos y culturales de verdadero Rhizobium. Fué empleada en dos modalidades: Una resiembra de cinco meses de antigüedad, en frascos planos tapados con guata, y después conservados cerrados con tapón metálico, con corcho y rosca, y otra resiembra de unos días antes del experimento.

Estirpe 93. Procedente de Pisum sativum, raíces remitidas desde Murcia, que fué aislada en febrero de 1952, y empleada, igualmente a la anterior, en resiembras reciente y antigua.

Para mayor comprensión resumiremos en el cuadro 10 las variables que figuran en el experimento:

La técnica seguida para el experimento fué como sigue: Se emplearon macetas sin drenaje, conteniendo material para el crecimiento de las plantas según el siguiente esquema:




Como se ve en el dibujo, las macetas contienen primero una estrecha capa de grava gruesa, de unos dos centímetros de espesor. Sobre ésta se halla la capa principal y de mayor volumen, constituída por «vermiculita», que suple con ventaja a la arena lavada, ya que su bajo

CUADRO n.º 10

| LEGUMINOSA SEMBRADA | Macetas |
|---|---|
| Testigos. (Sin inocular.) | 15 - 57 - 99 |
| Inoculadas con estirpe 3; aislada de un nódulo de *Vicia faba* y que por su procedencia y aspecto de la colonia fué tomada como un supuesto *Rhizobium*, pero no se siguió identificación bacteriológica completa. | 16 - 58 - 100 |
| Inoculadas con estirpe 13 aislada del mismo nódulo que la anterior, pero de otra colonia del medio 79M muy semejante; esta estirpe también se la cree probable *Rhizobium*, por su procedencia y aspecto, pero tampoco siguió caracterización bacteriológica completa. | 17 - 59 - 101 |
| Inoculadas con *Rhizobium leguminosarum*, estirpe 1.113, aislada de *Vicia faba;* su identificación bacteriológica fué completa, según se detalla en el cuadro núm. 3; la resiembra empleada en estas macetas databa de cinco meses de antigüedad en medio 79m, y fué conservada en frasco plano de 100 c. c. | 18 - 60 - 102 |
| Inoculadas con idéntica estirpe que las anteriores, pero de resiembra reciente, de unos días antes del experimento. | 19 - 61 - 103 |
| Inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* estirpe 93, aislada de *Pisum sativu* completamente identificada, según se detalla en el cuadro núm. 4, y fué empleada en resiembra de cinco meses de antigüedad. | 20 - 62 - 104 |
| Inoculadas con igual estirpe que las anteriores, pero a partir de una resiembra efectuada unos días antes del experimento. | 21 - 63 - 105 |

coste y condiciones de aireación son preferibles a las de aquélla, y en su composición química, que es la siguiente, está ausente el nitrógeno:

| | | |
|---|---|---|
| Humedad ... ... ... ... ... ... ... ... ... | 1,25 | por 100. |
| Sílice ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... | 39,00 | » |
| Oxido de hierro ... ... ... ... ... ... ... | 11,04 | » |
| Oxido de aluminio ... ... ... ... ... ... ... | 14,16 | » |
| Oxido de titanio ... ... ... ... ... ... ... | 1,40 | » |
| Oxido de calcio ... ... ... ... ... ... ... | 1,08 | » |
| Oxido de magnesio ... ... ... ... ... ... | 21,90 | » |
| Oxidos de sodio y potasio ... ... ... ... | 4,88 | » |
| Cloro ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... | Indicios. | |
| Trióxido de azufre ... ... ... ... ... ... | 0,02 | » |
| Pérdida por calcinación ... ... ... ... ... . | 4,085 | |

La anterior composición se refiere a muestra exfoliada, y se expresa también la pérdida por calcinación.

Es una mica no exfoliada, sino con un aumento considerable de volumen por efecto de la temperatura a que se la somete, tomando aspecto vermicular, a lo que debe su nombre; ha sido ya utilizada en estas experiencias por Allen en Estados Unidos. Es posible que en España sea este trabajo el primero que lo utiliza para esta clase de experimentos; presenta una enorme ventaja sobre la arena, en lo que se refiere a su más fácil esterilización, como se dirá más adelante.

Y finalmente, sobre esta verniculita, se coloca una ligera capa de arena lavada, sobre la cual se pondrán las semillas o, mejor, plantitas del semillero, seleccionadas como se dirá después.

La maceta confeccionada de la manera expuesta, conteniendo las tres capas citadas, es atravesada por un tubo de unos 20 milímetros de diámetro por 200 milímetros de largo, sin fondo, esto es, abiertos en los dos extremos; dicho tubo, como se ve en el dibujo, llega hasta la capa de grava gruesa, se obturará con guata y está destinado a hacer llegar la solución nutritiva o el agua para efectuar el riego por subirrigación.

Una vez dispuestas así las macetas se cubren con papel sujeto con bramante y se somete a la esterilización.

Para esta clase de trabajos se cita siempre la esterilización al autoclave a 115° C., durante un tiempo largo, unas ocho horas, con objeto

de asegurar una completa esterilización; esta técnica, tratándose de arena y disponiendo de autoclaves horizontales, capaces de contener gran número de macetas en un solo plano, es muy correcta; pero cuando los autoclaves son de tipo vertical, difícilmente se pueden poner en un solo piso más que tres o cuatro macetas; si se ponen en dos pisos gotean unas sobre otras; como en la parte general del experimento el número de éstas llega a 126, y esperando una más fácil esterilización de la vermiculita, se decidió hacer pruebas para esterilizar en horno de Pasteur, que por su capacidad y forma es adecuado para esterilizar hasta 16 cada vez. Efectivamente, las macetas con arena son difíciles de esterilizar a calor seco, pues se hicieron pruebas con varias y se apreció la dificultad de alcanzar la temperatura deseada, que no llega nunca a la parte central, ni aun con tiempos de esterilización de varias horas, fenómeno comprobado por la no fusión del testigo (ácido salicílico mezclado con azul de metileno en polvo) colocado en el interior de la maceta y corroborado por la presencia de colonias microbianas en las placas sembradas con arena, así tratada de esterilizar.

El caso de las macetas con vermiculita, o con los componentes que figuran en el dibujo antes citado, es bien distinto. La temperatura del horno se alcanza con mayor rapidez, pues la fusión del testigo se logra antes de pasar una hora desde su introducción en el horno, y aun así se dejan otra hora más para asegurarse de la buena esterilización. El logro de ésta se comprobó sembrando el material del centro de una de las macetas situadas en la parte más alejada de las paredes y del fondo del horno, y no apareciendo colonias bacterianas, ni aun después de varios días de incubación de las siembras en medios apropiados a distintas temperaturas.

Una vez esterilizadas de esta manera las macetas con poca antelación a su empleo, están dispuestas para sembrar en ellas las semillas, desinfectadas previamente.

Este es un aspecto muy interesante sobre el que la práctica nos ha inducido a introducir algunas modificaciones.

Se ha operado en la experiencia base con semillas tan dispares de tamaño como el trébol y la alfalfa, y las de los géneros Phaseolus y Lupinus; pero vamos a referirnos solamente a las del guisante o Pisum sativum que, por su tamaño medio, puede establecer una norma adecuada para este método. El corrientemente empleado para la

desinfección de semillas en esta clase de experimentos consiste en la inmersión de las mismas durante veinte o treinta minutos en solución de cloruro mercúrico al 1/1.000; éste ha sido, con algunas modificaciones, el que se ha seguido, por haber comprobado que es con el que se obtiene el menor porcentaje (menos del 15 por 100) de semillas defectuosamente desinfectadas, compatibles con el mayor tanto por ciento de semillas germinativas.

(Posteriormente a estos trabajos, el Dr. Gerretsen, Profesor de la Universidad de Gronigen, demostró en este laboratorio una técnica aun más rigurosa para la desinfección de semillas, que consiste, nada menos, que en tratarlas con ácido sulfúrico concentrado durante veinte minutos, agitando frecuentemente, seguido de lavados muy rápidos, repetidos tres o cuatro veces, con agua estéril, después de los cuales se trata con agua de cloro al 10 por 100, o hipoclorito sódico de equivalente valor, durante otros veinte minutos, y nuevos tratamientos con agua para eliminar los indicios de éste.

Empleado este método para otros experimentos de este mismo laboratorio con las mismas semillas de alfalfa usadas en el presente, se ha obtenido un porcentaje de semillas germinadas y libres de colonias de más del 90 por 100.)

El resumen de la técnica seguida en este experimento base, en lo concerniente a la desinfección de las semilas, es el siguiente: Se colocan en un matraz de Erlenmeyer, con alcohol de 70°, durante tres a cinco minutos, con objeto de que al ser sumergidas después en el desinfectante propiamente dicho, las semillas se mojen por igual, aun en la región del «hilo», en donde, sin este tratamiento, se forman, por efectos de fenómenos de tensión superficial, algunas burbujitas que impiden la perfecta desinfección de esta parte; este defecto es la causa del considerable aumento del tanto por ciento de semillas contaminadas, que también se puede evitar operando en vacío parcial. Después del alcohol y sin nuevos lavados, se sigue con el cloruro mercúrico, en cuyo desinfectante ya se dijo que deben estar de 20 a 30 minutos, dependiendo del tamaño de las semillas y de la mayor o menor rugosidad de su cubierta. A continuación se lavan repetidas veces (unas seis u ocho) con agua estéril y en la última el agua es conveniente que esté a temperatura de unos 60° C. para ablandar las semillas y facilitar su germinación.

La rigurosidad del procedimento anterior no da seguridad absoluta

de la perfecta desinfección, y mucho menos de su capacidad germinativa, punto éste importantísimo en este experimento, para eliminar la posibilidad de que en alguna maceta se siembren semillas con escaso poder germinativo, falseando los resultados obtenidos.

Por esto se ha procurado encontrar métodos sencillos, pero seguros, para comprobar las dos condiciones citadas. Para las semillas pequeñas (alfalfa y trébol) se ha seguido el método de otros investigadores, de colocarlas convenientemente separadas en placas de Petri con medios nutritivos apropiados, que fueron el citado 79 y otro a base de agar-glucosado, convenientemente diluído en agar-agua al doble de su volumen, condición importante, pues si se emplea sin diluir la germinación de las semillas es casi inhibida por completo por el exceso de caldo y de glucosa.

Varios autores preconizan para las semillas medianas y grandes emplear, en vez de placas, tubos estrangulados con medio líquido, hasta que la semilla, colocada con el «hilo» hacia abajo, quede sumergida en su mitad inferior y después, para comprobar la buena desinfección de la mitad superior, se imprimen ligeras sacudidas al tubo para que el caldo o medio líquido llegue a mojar toda la semilla y al cabo del tiempo conveniente de incubación, juzgar de la contaminación por el enturbiamiento o no del líquido.

Este método no es objetable cuando en los experimentos se trabaje con número no muy elevado de semillas; pero en un trabajo con el volumen de este experimento base resulta casi impracticable, pues hay que comprobar la desinfección perfecta de 400 semillas para cada grupo o lote que, al ser éstos cuatro, obliga a operar con una cifra aproximada de 1.600 semillas grandes, sin tener en cuenta los dos grupos de trébol y alfalfa, en los que por su tamaño ya se hacía en placas en vez de tubos.

Por este considerable volumen se pensó emplear para las semillas medianas y grandes el mismo método que para las pequeñas, sustituyendo las placas por grandes cristalizadores de unos 30 centímetros de diámetro, cubiertos con papel sujeto con bramante y esterilizados, en los cuales se vertió el medio 79 en cantidad suficiente para formar una capa de unos dos centímetros de espesor. Antes de que el medio esté completamente frío, es decir, a una temperatura de unos 45 a 50 grados, que aún queda algo blando, se depositan sobre él, con el «hilo» hacia abajo, las semi-

llas procedentes del matraz con agua a 60°, y aprovechando la poca consistencia del medio, se hace una ligera huella que sirva para evitar que al mover o trasladar el cristalizador las semillas rueden y se junten unas con otras; el número de éstas para cada cristalizador es de 60.

Al cabo de veinticuatro horas en estas condiciones favorables de humedad y temperatura en la estufa a 25°, ya se observan algunas que empiezan a germinar, y hasta se inician las colonias en aquellas que no fueron bien desinfectadas. Sólo resta comprobar la ausencia de gérmenes en la parte de la semilla que no está en contacto con el medio, para lo cual se rociaron una por una con varias gotas de caldo glucosado diluído al 1/3 para, de esta forma, arrastrar los posibles gérmenes hasta el medio sólido, manifestándose colonias en la vecindad de cada semilla (de cada cristalizador con 60 de éstas sólo una o dos dan colonias, por contacto, y después del goteo con caldo aparecen otras cinco o seis, en las cuales, de no haberlas rociado como se hizo, los gérmenes no se hubieran manifestado desarrollándose, formando colonias en la superficie del medio sólido).

Pasadas cuarenta y ocho horas se comprobó que la presencia de colonias no progresaba, y a las setenta y dos se eligieron las semillas que, libres de microbios, tenían un grado semejante de germinación, dejando las muy precoces y aquellas otras que no han germinado o que inician la germinación.

Llega el momento de colocar las semillas en las macetas, previamente esterilizadas con poca antelación, según se expuso; se separa la cubierta de papel y sobre la capa de arena superior se van colocando las semillas convenientemente separadas, operando con pinzas estériles y teniendo cuidado de no romper la incipiente raicilla, siendo ahora cuando las semillas que han de ser inoculadas recibirán la suspensión de las bacterias, que se habrá tenido preparada y valorada con anterioridad de la manera siguiente:

A cada tubo con medio inclinado 79M se le añade agua estéril hasta el borde del medio, separando la estría del crecimiento bacteriano, con ayuda de un asa de platino, removiéndola bien y vertiendo toda la suspensión a otro tubo estéril; en éste es donde se hace la homogeneización, agitando convenientemente, efectuando después el recuento para reconocer el número de bacterias de la emulsión. Este fué efectuado por el método directo de recuento y por el indirecto con relación a una sangre

con número de hematíes normal (5.000 millones por centímetro cúbico), siendo este último método el que ha dado resultados más constantes; una vez conocido el número aproximado de gérmenes se diluyó hasta la concentración de 1.000 millones por centímetro cúbico, sirviendo los tubos con la emulsión ya valorada como comparadores de otras, a fin de no repetir el recuento; de esta manera todos los inóculos llevan un número muy próximo al citado.

A cada semilla se le añaden diez gotas de la suspensión bacteriana, lo que supone un exceso de gérmenes y, seguidamente, se cubren con una ligera capa de arena estéril e inmediatamente se humedece ésta con agua también estéril para mantener la humedad óptima para una buena germinación y para evitar la desecación y probable muerte de gran parte de los gérmenes inoculados. Después se vuelve a colocar la cubierta de papel, pero sin sujetarle con bramante, y se dejan a la temperatura del laboratorio hasta afianzamiento de la plantita, evitando el encendido o escape del gas y procurando libre acceso del aire.

A diario se vuelven a humedecer ligeramente y con la misma cantidad de agua estéril, y cuando las plantitas llegaron a la altura de la cubierta de papel se separó definitivamente ésta y se subieron al invernadero, proveyéndolas ya de la solución nutritiva libre de nitrógeno.

Se ha elegido entre las más usadas la preparada a partir de la siguiente mezcla de sales, por ser la más completa y por ir provista de elementos trazas, tales como el cobre, manganeso y boro, de extraordinaria importancia en esta clase de experimentos. Su fórmula es ésta: (Bond's):

| | |
|---|---|
| Cloruro potásico ... ... ... ... ... ... ... ... | 31,70 grs. |
| Fosfato tricálcico ... ... ... ... ... ... ... ... | 18,00 » |
| Sulfato cálcico ... ... ... ... ... ... ... ... ... | 13,70 » |
| Sulfato magnésico ... ... ... ... ... ... ... ... | 5,50 » |
| Sulfato de hierro $(SO_4)_3Fe_2$ ... ... ... ... ... | 2,70 » |
| Sulfato de cobre ... ... ... ... ... ... ... ... ... | 0,50 » |
| Sulfato de manganeso ... ... ... ... ... ... | 0,60 » |
| Acido bórico ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... | 0,50 » |
| Fosfato dipotásico ... ... ... ... ... ... ... ... | 26,80 » |
| | 100,00 grs. |

Todas estas sales se pulverizan por separado, comenzando por las sales de manganeso y de cobre, después el ácido bórico y a esto incorporar la sal de hierro. Es muy importante pulverizar por separado el sulfato dipotásico y sólo cuando está bien reducido a polvo incorporarle el resto; si no se efectúa así nunca podrá obtenerse una mezcla de sales en la que todos los componentes estén debidamente repartidos y que reúna las debidas condiciones de homogeneidad indispensable para que todas las soluciones a partir de ella resulten de un pH de alrededor de 5,8 a 7,2.

De las mezcla de estas sales, preparada como se ha dicho y conservada en frasco bien tapado, se prepara la solución nutritiva, a partir de 1 gr. de ella, por cada 1.000 c. c. de agua; se calienta hasta ebullición y se deja en reposo toda la noche, para separar las materias insolubles, y después se filtra o se decanta con precaución.

Para la adición de esta solución se ha seguido el siguiente procedimiento:

Un frasco de 10 litros, provisto de llave esmerilada, se colocó sobre un soporte construído ex profeso y de una altura de 1,50 metros y provisto de ruedas giratorias, para poderle trasladar alrededor de la mesa central del invernadero, ocupada por las macetas. A la llave se adosó un tubo de goma de unos dos metros de largo, terminado, a su vez, por un tubo de cristal estirado en punta.

El primer riego con solución nutritiva se hizo por medio del tubo lateral de que van provistas todas las macetas y que se aprecia en el dibujo y en las fotografías; antes había sido calculada la humedad óptima para la cantidad de vermiculita de cada maceta, que resultó de 300 c. c., y esta fué la cantidad añadida a cada una; pero para evitar la inundación se efectuó muy lentamente, casi gota a gota, en iguales condiciones que se operó al calcular la capacidad. Cualquier defecto de técnica en este período hubiera provocado una inundación y hubiera removido las débiles plantitas, inutilizando el experimento; con la cantidad dicha y a la velocidad expresada el líquido llegaba por su subirrigación a la capa más superficial de arena, humedeciendo sólo ligeramente ésta. Dado el número de macetas y no obstante disponer de dos frascos regadores, se empleó un día completo en este primer riego.

En los días siguientes a esta adición de solución nutritiva sólo se empleó agua para regar en cantidad idéntica para cada maceta y por medio del

tubo lateral. En lugar de medir los 100 c. c. calculados como óptimos para cada maceta, en los riegos siguientes al primero, con auxilio de una probeta, se reguló la llave del frasco, de tal manera, que el gasto o salida de líquido fuera el de 100 c. c. en veinticinco segundos, y como las macetas estaban colocadas con los tubos alineados, el paso de una a otra se hacía sin pérdida de líquido y con relativa rapidez se regaba todo el experimento de 126 macetas, teniendo seguridad de operar para todas en idénticas condiciones, punto importantísimo, sobre todo, en el comienzo del experimento.

Los riegos en estas condiciones fueron diarios y la adición de solución nutritiva una vez por semana al principio; y a medida que el crecimiento progresaba se hizo dos veces por semana, y hasta cada dos días. Los días más calurosos de julio se daban dos riegos, uno por la mañana y otro al final del día.

# INFORMACION

## PRIMERA REUNION EUROPEA DE NORMALIZACION BIOLOGICA

En el cuadro de la Asociación Internacional de las Sociedades de Microbiología, y patrocinada por la Sección Especial de Comprobación Inmunomicrobiológica, se proyecta celebrar la Reunión citada, del 21 al 25 del próximo junio, en la ciudad francesa de Lyón. Los temas a tratar son los siguientes:

«La normalización y la comprobación de las tuberculinas en medicina humana y en mecidina veterinaria».

«La normalización y la comprobación de las anatoxinas contra la difteria y el tétanos».

«La normalización y la comprobación de la vacuna contra la poliomielitis».

«La normalización y la comprobación de las gamma-globulinas».

Para toda clase de informes dirigirse a: «Secrétariat R. E. S. B., 17, Rue Bourgelat, Lyón (France)».

## CONFERENCIANTES ITALIANOS

Organizadas por el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, y la Sociedad de Microbiólogos Españoles, se han celebrado en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, los días 2 y 7 de marzo, dos conferencias a cargo de los Dres. Aristide Carilli y Filippo Dentice di Accadia, miembros ambos del Instituto Superior de Sanidad de Roma. El primero disertó sobre «Estirpes mutantes de Penicillium chrysogenum y sus técnicas», y el segundo acerca de «Fuentes de carbono para el Penicillium chrysogenum en la producción de penicilina».

## ACTAS DE LA SOCIEDAD

### MADRID

**Acta de la Sesión celebrada el día 7 de junio de 1954.**

Bajo la presidencia de D. Antonio Ruiz Falcó y actuando como Secretario D. Lorenzo Vilas, se abre la Sesión a las 20,15 horas en la sala de actos del Instituto «Daza de Valdés», de Optica, del C. S. I. C., Serrano, 121.

Se aprueba el Acta de la Sesión anterior. Es admitido como socio de número D. Rodrigo Moreno San Martín, Farmacéutico, de Madrid, presentado por D. Miguel Rubio y D. Román Vicente. A cantinuación, el señor Rubio Huertos presenta su trabajo «Microscopía electrónica de las formas L y filtrables de algunas bacterias». El Sr. Socías felicita al comunicante por los resultados obtenidos y expone una interpretación propia de algunos de los hechos que acaban de ser expuestos. Se entabla una animada discusión en la que intervienen también los Sres. Regueiro y Vicente.

Por último, el Sr. Feduchy da lectura a un trabajo de los Sres. Ramírez y Boidín titulado «Nueva especie de lavadura aislada de líquido curtiente: *Saccharomyces Chambardi nov. sp.*». El señor Vilas y el Sr. Socías hacen comentarios acerca de la nueva especie.

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión a las 21,50 horas.

## IX CONGRESO INTERNACIONAL DEL FRIO

El Instituto Internacional del Frío organiza actualmente su IX Congreso Internacional, que tendrá lugar en Francia del 31 de agosto al 15 de septiembre de 1955. Las sesiones de trabajo se celebrarán en los salones y anfiteatros de la Universidad de la Sorbona, en París, del 31 de agosto al 8 de septiembre, habiendo sido previstas una serie de visitas y excursiones del 9 al 15 de septiembre.

Un Congreso Internacional del Frío se celebra cada cuatro años en la capital de uno de los países firmantes del Convenio Internacional del 21 de júnio de 1920, por el que se creó el Instituto Internacional del Frío.

Numerosas personalidades tomarán parte en esta manifestación, en el curso de la cual serán expuestos y discutidos los problemas científicos, técnicos y económicos que se plantean en el vasto dominio de las aplicaciones del frío.

Las personas interesadas por el mismo podrán dirigirse, a la mayor brevedad posible, al Centro-Experimental del Frío, del Patronato «Juan de la Cierva», de Investigación Técnica, del C. S. I. C. (Serrano, 150. Tel. 342400, Madrid), Miembro Corresponsal del citado Instituto, donde se les facilitará amplia información sobre el avance de programa técnico del mencionado Congreso, así como sobre el reglamento para la presentación de trabajos.

# OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

**ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.**—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

**ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».**—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

**ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».**—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

**COLLECTANEA BOTANICA.**—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 30 pesetas. Suscripción, 45 pesetas.

**FARMACOGNOSIA.**—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

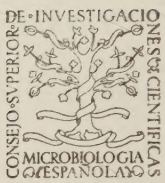
Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

**GENETICA IBERICA.**—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.


CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA